



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DARMSTADT

ULB

Kurz- und langfristige Auswirkungen strahleninduzierter DNS Doppelstrangbrüche auf das neuronale Netzwerk am in vitro und in vivo Mausmodell

Häupl, Katja
(2020)

DOI (TUprints): <https://doi.org/10.25534/tuprints-00015393>

Lizenz:



CC-BY-SA 4.0 International - Creative Commons, Namensnennung, Weitergabe unter gleichen Bedingungen

Publikationstyp: Dissertation

Fachbereich: 10 Fachbereich Biologie

Quelle des Originals: <https://tuprints.ulb.tu-darmstadt.de/15393>



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DARMSTADT

Kurz- und langfristige Auswirkungen strahleninduzierter DNS Doppelstrangbrüche auf das neuronale Netzwerk am *in vitro* und *in vivo* Mausmodell

Dem Fachbereich Biologie
der Technischen Universität Darmstadt
zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doctor rerum naturalium

genehmigte Dissertation

von

M.Sc. Katja Häupl

geboren am 03.02.1990

in Rostock

Erstgutachter: Prof. Dr. Bodo Laube

Zweitgutachter: Prof. Dr. Gerhard Thiel

Tag der Einreichung: 19.10.2020

Tag der mündlichen Prüfung: 26.11.2020

Darmstadt 2020

Häupl, Katja: Kurz- und langfristige Auswirkungen strahleninduzierter DNS Doppelstrangbrüche auf
das neuronale Netzwerk am *in vitro* und *in vivo* Mausmodell
Darmstadt, Technische Universität Darmstadt
Jahr der Veröffentlichung der Dissertation auf TUpriints: 2020
URN: urn:nbn:de:tuda-tuprints-153937
Tag der mündlichen Prüfung: 26.11.2020

Veröffentlicht unter CC BY-SA 4.0 International
<https://creativecommons.org/licenses/>



Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe.

Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sowie sämtliche von Anderen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher bei keiner anderen Hochschule zu Prüfungszwecken eingereicht.

Darmstadt, den 19. Oktober 2020

Inhaltsverzeichnis

Ehrenwörtliche Erklärung	I
Inhaltsverzeichnis	II
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis.....	VII
Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
1 Zusammenfassung	1
2 Summary	3
3 Einleitung	5
3.1.1 Die adulte Neurogenese im Säugerhirn.....	5
3.1.2 Ionisierende Strahlung und ihr Einfluss auf die embryonale und adulte Neurogenese.....	9
3.1.3 Zielsetzung.....	10
4 Kapitel I: Langfristige Folgen niedrigdosierter Röntgenstrahlung auf das HR-defiziente Mausmodell Rad54^{-/-}	12
4.1 Einleitung Kap I	12
4.1.1 Der Hippocampus und die Auswirkung ionisierender Strahlung auf seine Funktion.....	12
4.1.2 Die Rolle von Rad54 während der homologen Rekombination und die Auswirkungen eines <i>knock out</i> im Mausmodell	14
4.2 Material und Methoden Kap I.....	19
4.2.1 Das RAD54 ^{-/-} Mausmodell.....	19
4.2.2 Genotypisierung der RAD54 ^{-/-} Mäuse	20
4.2.3 Bestrahlung der RAD54 ^{-/-} Tiere im E14.5 oder p10 Stadium	21
4.2.4 Motorischer Test <i>RotaRod</i>	22
4.2.5 Elevated Zero Maze (EZM).....	23
4.2.6 Morris Water Maze.....	24
4.2.7 Auswertung Verhaltensversuche.....	27
4.2.8 Einbettung der RAD54 ^{-/-} Gehirne	28
4.2.9 Beschichtung der Objektträger.....	29
4.2.10 Anfertigung der Kryoschnitte	29
4.2.11 Nissl-Färbung	29
4.2.12 Immunhistologische Färbung	30
4.2.13 Auswertung Histologie.....	30
4.3 Ergebnisse Kap I	32
4.3.1 Vergleich der motorischen Eigenschaften und des Explorationsverhaltens der röntgen- bzw. sham bestrahlten Rad54 ^{-/-} Mäuse	32
4.3.2 Vergleich des räumlichen Lernverhaltens der an E14.5 sham und 500 mGy bestrahlten Rad54 ^{-/-} Tiere.....	35
4.3.3 Vergleich des räumlichen Lernverhaltens der an p10 sham und 500 mGy bestrahlten Rad54 ^{-/-} Tiere.....	39
4.3.4 Vergleich Wildtyp- und Rad54 ^{-/-} Tiere	44
4.3.5 Histologische Analyse der DCX positiven Zellen im <i>Gyrus dentatus</i> der Wildtyp- und Rad54 ^{-/-} Tiere	57

4.4	Diskussion Kap I	60
4.4.1	Der Verlust des Rad54-Proteins führt zu Defekten in der adulten Neurogenese	61
4.4.2	Die adulte Neurogenese ist ausschlaggebend für komplexes räumliches Lernen	63
5	Kapitel II: Auswirkungen strahleninduzierter DNS Doppelstrangbrüche in neuronalen Zellen am murinen <i>in vitro</i> Modell	67
5.1	Einleitung Kap II	67
5.1.1	Der NHEJ-Reparaturweg und das Reparaturprotein 53BP1	67
5.1.2	DNS Doppelstrangbrüche als Regulatoren für die Transkription von Überlebensgenen	71
5.2	Material und Methoden Kap II.....	74
5.2.1	Zelllinie J1 NSZ	74
5.2.2	Kultivierung der neuronalen Stammzellen J1	74
5.2.3	Differenzierungsprotokoll.....	74
5.2.4	Röntgenbestrahlung	75
5.2.5	Über Nacht Behandlung der Zellen mit unterschiedlichen Agenzien	75
5.2.6	Apoptose-Assay	76
5.2.7	MTT-Assay.....	77
5.2.8	Antikörperfärbung	77
5.2.9	Mikroskopie	79
5.2.10	Mikroelektrodenarray (MEA)	79
5.2.11	Auswertung.....	81
5.3	Ergebnisse Kap II	82
5.3.1	Differenzierung des <i>in vitro</i> Modellsystems J1 NSZ zu homogenen Deszendentenkulturen	82
5.3.2	Bestimmung eines Reparaturproteins zur Markierung von DNS DSBs	90
5.3.3	Vergleich der DNS DSB-Reparaturverläufe der neuronalen Stammzellen und dessen Deszendenten nach 500 mGy Röntgenbestrahlung.....	92
5.3.4	Verbesserte Reparatur strahleninduzierter DNS DSBs in Neuronen nach Glutamat Behandlung.....	97
5.3.5	Protektiver Effekt Glutamats auf neuronale Spontanaktivität, welche durch Niedrigdosisbestrahlung reduziert wurde.....	106
5.4	Diskussion Kap II	114
5.4.1	Verzögerte Reparatur von strahleninduzierten DNS Doppelstrangbrüchen in Neuronen.....	114
5.4.2	Die Aktivierung des glutamatergen Systems induziert DNS DSBs und verbessert simultan die Reparatur strahleninduzierter DNS DSBs in Neuronen	115
5.4.3	NMDAR-mediierter Signalweg führt zur Verbesserung der Reparatur strahleninduzierter DNS DSBs - einzigartig in Neuronen.....	117
5.4.4	Protektiver Effekt Glutamats auf die Spontanaktivität von Neuronen	119
6	Diskussion	122
6.1	Schlussfolgerung	127
7	Literaturverzeichnis	129
	Curriculum vitae.....	151
	Danksagung.....	152

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Differenzierungspotential radialer Gliazellen und detaillierter Differenzierungsverlauf von Neuronen..	7
Abbildung 2: Gitter- und Ortszellen des Hippocampus und des entorhinalen Cortex.	14
Abbildung 3: DNS Doppelstrangbruchreparatur über die homologe Rekombination.....	17
Abbildung 4: Repräsentative Agarosegelaufnahme der Genotypisierung der Rad54 Mäuse.	21
Abbildung 5: Schematischer Aufbau des <i>RotaRod</i> -Tests.	22
Abbildung 6: Schematischer Aufbau des <i>Elevated Zero Maze</i> -Tests.	23
Abbildung 7: Schematische Darstellung des <i>Morris Water Maze</i> -Tests.	25
Abbildung 8: Kategorisierung der MWM-Suchstrategien nach Graziano.	28
Abbildung 9: Rad54 ^{-/-} Tiere zeigten keine behandlungsbedingten Auffälligkeiten im <i>RotaRod</i> -Test.	33
Abbildung 10: Rad54 ^{-/-} Tiere zeigten keine behandlungsbedingten Auffälligkeiten im <i>EZM</i> -Test.	34
Abbildung 11: Ähnliches Lernverhalten der an E14.5 sham/ 500 mGy bestrahlten Rad54 ^{-/-} Tiere, während der initialen Phase des <i>MWM</i> -Tests.	36
Abbildung 12: Behandlungsunabhängiges Verhalten der an E14.5 sham/ 500 mGy bestrahlten Rad54 ^{-/-} Tiere im Probe-versuch der initialen Phase.	37
Abbildung 13: Keine Unterschiede im Lernverhalten der an E14.5 sham/ 500 mGy bestrahlten Rad54 ^{-/-} Tiere während der Umkehrphase des <i>MWM</i> -Tests.....	38
Abbildung 14: Behandlungsunabhängiges Verhalten der an E14.5 sham/ 500 mGy bestrahlten Rad54 ^{-/-} Tiere im Probe-versuch der Umkehrphase.	39
Abbildung 15: Kaum Unterschiede im Lernverhalten der an p10 sham/ 500 mGy bestrahlten Rad54 ^{-/-} Tiere während der initialen Phase des <i>MWM</i> -Tests.....	40
Abbildung 16: Behandlungsunabhängiges Verhalten der an p10 sham/ 500 mGy bestrahlten Rad54 ^{-/-} Tiere im Probeversuch der initialen Phase.	41
Abbildung 17: Keine signifikanten Unterschiede im Lernverhalten der an p10 sham/ 500 mGy bestrahlten Rad54 ^{-/-} Tiere während der Umkehrphase des <i>MWM</i> -Tests.	42
Abbildung 18: Behandlungsunabhängiges Verhalten der an p10 sham/ 500 mGy bestrahlten Rad54 ^{-/-} Tiere im Probeversuch der Umkehrphase.	43

<hr/>	
Abbildung 19: Keine signifikanten Unterschiede in der Motorik und dem Explorationsverhalten zwischen WT- und Rad54 ^{-/-} Mäusen.	45
Abbildung 20: Verzögertes Lernverhalten der an E14.5 sham bestrahlten Rad54 ^{-/-} Tiere während der initialen Phase des <i>MWM</i> -Tests.	46
Abbildung 21: Anfänglich verzögertes Lernverhalten der an E14.5 sham bestrahlten Rad54 ^{-/-} Tiere während der Umkehr-phase des <i>MWM</i> -Tests.	48
Abbildung 22: Fast identisches Lernverhalten der an E14.5 500 mGy bestrahlten Rad54 ^{-/-} und Wildtypiere während der initialen Phase des <i>MWM</i> -Tests.	49
Abbildung 23: Fast identisches Lernverhalten der an E14.5 500 mGy bestrahlten Rad54 ^{-/-} und Wildtypiere während der Umkehrphase des <i>MWM</i> -Tests.	50
Abbildung 24: Stark beeinträchtigtes Lernverhalten der an p10 sham bestrahlten Rad54 ^{-/-} Tiere während der initialen Phase des <i>MWM</i> -Tests.	52
Abbildung 25: Anhaltendes beeinträchtigtes Lernverhalten der an p10 sham bestrahlten Rad54 ^{-/-} Mäuse während der Umkehrphase des <i>MWM</i> -Tests.	53
Abbildung 26: Fast identisches Lernverhalten der an p10 500 mGy bestrahlten Rad54 ^{-/-} und Wildtypiere während der initialen Phase des <i>MWM</i> -Tests.	55
Abbildung 27: Fast identisches Lernverhalten der an p10 500 mGy bestrahlten Rad54 ^{-/-} und Wildtypiere während der Umkehrphase des <i>MWM</i> -Tests.	56
Abbildung 28: Naive Rad54 ^{-/-} Tiere exprimierten signifikant weniger DCX positive Zellen als Wildtypiere.	58
Abbildung 29: Bestrahlungszeitpunkt hatte keinen Einfluss auf die Anzahl der DCX positiven Zellen in Rad54 ^{-/-} Mäusen.	59
Abbildung 30: DNS DSB-Induktion und -Reparatur über die NHEJ.	70
Abbildung 31: Mechanismus der durch neuronale Aktivität induzierten Genregulation.	72
Abbildung 32: Schematische Darstellung der IBIDI® Zellkulturware μ -Slide VI 0.4.	77
Abbildung 33: Aufbau des MEA2100-Systems der Firma Multi Channel Systems MCS GmbH.	79
Abbildung 34: MEA-Chip und -Software.	80
Abbildung 35: Morphologische Veränderungen während des Differenzierungsprozesses von neuronalen Stammzellen zu Neuronen.	82
Abbildung 36: Morphologische Veränderungen während des Differenzierungsprozesses von neuronalen Stammzellen zu Astrozyten.	83

Abbildung 37: Morphologische Veränderungen während des Differenzierungsprozesses von neuronalen Stammzellen zu Oligodendrozyten.	85
Abbildung 38: Deszendentskulturen verloren Stammzellcharakter und exprimierten strukturspezifische Proteine.	86
Abbildung 39: Gerichtete Differenzierung führte zu homogenen Deszendentskulturen.	87
Abbildung 40: Immunfluoreszenzbestimmung der Neuronenarten in ausdifferenzierten Neuronenkulturen.	89
Abbildung 41: Ähnliche Reparaturverläufe der 53BP1- und γH2AX-Proteine während der frühen Phase der DSB-Reparatur in Neuronen und Astrozyten.	91
Abbildung 42: Neurone zeigten Defizite in der späten Phase der DNS DSB-Reparatur.	94
Abbildung 43: Keine erhöhte Apoptose in den neuronalen Stamm- und Gliazellen nach 500 mGy Bestrahlung.	96
Abbildung 44: Glutamat steigerte die Reparatureffizienz von strahleninduzierten Doppelstrangbrüchen in Neuronen.	100
Abbildung 45: Immunfluoreszenzmarkierung der NMDA-Untereinheiten NR1, NR2A und NR2B in NSZ, Neuronen und Astrozyten.	104
Abbildung 46: Glutamat steigerte nicht die Reparatureffizienz von strahleninduzierten DNS DSBs in Glia- und Stammzellen.	105
Abbildung 47: Differenzierung von Neuronenkulturen auf MEA-Chips.	107
Abbildung 48: Repräsentative Rasterplots zeigen Aktivitätsminderung nach Bestrahlung und protektiven Effekt durch Glutamatbehandlung.	108
Abbildung 49: Protektiver Effekt durch Glutamatbehandlung auf Spontanaktivität und Amplitudengröße in Neuronenkulturen.	110
Abbildung 50: Keine veränderte Zellvitalität der Neuronen nach Glutamatbehandlung, und, oder 500 mGy Bestrahlung.	112

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Primer Sequenzen der RAD54 ^{-/-} Genotypisierung	20
Tabelle 2: PCR Protokoll	20
Tabelle 3: Differenzierungsmedien	75
Tabelle 4: Liste der verwendeten primären Antikörper.....	78
Tabelle 5: Liste der verwendeten sekundären Antikörper	79

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µm	Mikrometer
µV	Mikrovolt
53BP1	<i>p53-binding protein</i>
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AMPA	<i>A-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor</i>
Astro.	Astrozyten
ATM	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	<i>Ataxia Telangiectasia and Rad3 related PI3K</i> der Phosphoinositid-3-Kinase
BLM	<i>Bloom's syndrome helicase</i>
bp	Basenpaare
BRCA1, 2	<i>Breast cancer gene 1, 2</i>
ca.	circa
Ca ²⁺	Calcium
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CT	Computertomographie
DCX	<i>Doublecortin</i>
ddH ₂ O	<i>double-distilled water</i>
DN2	<i>DNA replication ATP-dependent helicase</i>
DNA-PKcs	<i>DNA dependent protein kinase, catalytic subunit</i>
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSB	Doppelstrangbruch
DSIF	<i>DRB sensitivity-inducing factor</i>
E14.5	Embryonalstadium Tag 14.5
EAATs	exzitatorische Aminosäure-Transporter
eRNA	<i>enhancer RNA</i>
EXO1	Exonuklease 1
EZM	<i>Elevated Zero Maze</i>
FKS	Fetales Kälberserum

GABA	γ -Aminobuttersäure
GD	<i>Gyrus dentatus</i>
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
Glu	Glutamat
Gly	Glyzin
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
Gy	Gray
HCl	Salzsäure
HR	homologe Rekombination
ID	Identifikationsnummer
IEGs	<i>immediate early genes</i>
ko	<i>knock out</i>
kV	kilo Volt
Lsg.	Lösung
LTPs	Langzeitpotenzierungen
mA	milli Ampere
MAP-2	<i>microtubuli-associated protein 2</i>
max.	Maximum
MBP	<i>myelin basic protein</i>
MEA	Mikroelektrodenarray
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mGy	milli Gray
min.	Minute
mm	Millimeter
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MWM	<i>Morris Water Maze</i>
NELF	<i>negative elongation factor</i>
NHEJ	nicht-homologe Endverknüpfung
NMDAR	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor
NSZ	neuronale Stammzellen
NTP	nicht technische Projektzusammenfassung
Olig2	<i>oligodendrocyte transcription factor 2</i>
Oligo.	Oligodendrozyten
p10	postnatal-Stadium Tag 10

PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
Pen/ Strep	Penicillin/ Streptomycin
perm.	permanent
PFA	Paraformaldehyd
prim.	primär
PSD95	<i>postsynaptic density protein 95</i>
RNAIIP	RNA-Polymerase-II
ROS	radikale Sauerstoffspezies
RPA	Replikationsprotein A
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.	siehe
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDSA	<i>synthesis-dependent strand annealing</i>
sek.	sekundär
SEM	<i>standard error of the mean</i> - Standardfehler des Mittelwertes
SGZ	subgranuläre Zone
SVZ	subventrikuläre Zone
Syn	Synaptophysin
T3	Triiodthyronin
Tab.	Tabelle
Top2B	Topoisomerase II-beta
TUD	Technische Universität Darmstadt
U	Einheit
UE	Untereinheit
ün	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
VE Wasser	vollentsalztes Wasser
vgl.	vergleiche
WT	Wildtyp
XRCC4	<i>X-ray repair cross-complementing protein 4 XRCC4-like factor</i>

1 Zusammenfassung

Niedrigdosierte Röntgenstrahlung kommt heutzutage überwiegend in der medizinischen Bildgebung zum Einsatz und spielt dabei eine entscheidende Rolle in der Diagnostik. Besonders an Kleinkindern werden computertomographische Untersuchungen mit niedrigdosierter Röntgenstrahlung durchgeführt. Dabei ist der Kopf das am häufigsten untersuchte Körperteil. Neben der Verwendung in der medizinischen Diagnostik wird Röntgenstrahlung auch als Therapiemittel gegen Tumore eingesetzt. Zusätzlich werden Menschen bei Flug- und Weltraumreisen durch natürliche Strahlung belastet. Umso wichtiger ist die Untersuchung der Strahlungseffekte auf den Organismus. Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Analyse von Strahlungseffekten auf das neuronale Netzwerk. Ein direkter und zugleich folgenreicher Schaden der Röntgenstrahlung ist die Induktion von DNS-Doppelstrangbrüchen (DSBs). Proliferierende Zellen, zu denen unter anderem Stammzellen gehören, besitzen prinzipiell zwei Reparaturwege um DNS DSBs zu reparieren: die homologe Rekombination (HR) und die nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ). Ausdifferenzierte Zellen wie Neurone und Gliazellen können nur noch auf den häufig fehlerhaften NHEJ-Reparaturweg zurückgreifen. Nicht oder fehlerhaft reparierte DNS DSBs führen zu Seneszenz, Apoptose oder Zellentartung und können auf diese Weise die Pathogenese von Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson und Krebs fördern.

Um den Einfluss einer nicht funktionalen HR auf die Radiosensitivität im sich entwickelnden neuronalen Netzwerk zu untersuchen, wurde das HR-defiziente Rad54^{-/-} Mausmodell gewählt. Die Versuchstiere wurden während den neurologisch störungssensiblen Phasen E14.5 und p10 mit 500 mGy bestrahlt und im adulten Stadium hinsichtlich ihrer motorischen Fähigkeiten sowie ihres Explorations- und Lernverhaltens untersucht. Interessanterweise stellte sich beim Vergleich mit Wildtyptieren heraus, dass nicht nur röntgenbestrahlte Rad54^{-/-} Tiere sondern auch sham bestrahlte Kontrolltiere ein beeinträchtigtes Lernverhalten im *Morris Water Maze*-Test aufweisen. Motorische Fähigkeiten und Explorationsverhalten, die mit Hilfe des *RotaRod*- und *Elevated Zero Maze*-Tests überprüft wurden, sind hingegen nicht betroffen. Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass zwischen dem spezifischen Defizit im komplexen räumlichen Lernen und der Anzahl an *Doublecortin* (DCX)-positiven Zellen im *Gyrus dentatus* der Rad54^{-/-} Mäuse eine negative Korrelation besteht. Da DCX als Marker für junge Neurone etabliert ist, legt dieses Ergebnis die Schlussfolgerung nahe, dass eine gestörte adulte Neurogenese, die komplexe allozentrische Navigation erheblich beeinträchtigt.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die NHEJ-Reparatur in verschiedenen neuronalen Zelltypen analysiert. Dazu diente das *in vitro* Stammzellsystem J1. Vorteil dieses minimalistischen Systems ist die Möglichkeit, neuronale Stammzellen in homogene Deszendentenkulturen zu differenzieren, sodass Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten unabhängig voneinander hinsichtlich ihrer

Radiosensitivität untersucht werden können. Die Reparatur strahleninduzierter DNS DSBs wurde über die Immunfluoreszenzfärbung des Reparaturproteins 53BP1 verfolgt. Es zeigte sich, dass Neurone nach Bestrahlung mit 500 mGy eine drastisch verlangsamte Reparatur von DNS DSBs und eine signifikant reduzierte elektrische Spontanaktivität aufweisen. Die Spontanaktivität wurde über die Ableitung der Spannungsänderungen in der homogenen Neuronenkultur in einem Multielektrodenarray bestimmt. Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass eine Impulsbehandlung über Nacht mit dem exzitatorischen Neurotransmitter Glutamat eine signifikante Steigerung der Reparatureffizienz von strahleninduzierten DNS DSBs in Neuronen bewirkt. Zusätzlich schützt Glutamat das neuronale Netzwerk vor einer strahleninduzierten Dysfunktion. Dieser Effekt konnte darauf zurückgeführt werden, dass spezifische Agonisten des glutamatergen Systems durch Bindung an spezifische NMDA-Rezeptoren einen ausschließlich in Neuronen vorkommenden Signalweg induzieren, der zur Aktivierung der Topoisomerase II-beta und in Folge dessen zur Transkription von *immediate early genes* führt. Diese verstärken die DNS-Schadensantwort und wirken so neuroprotektiv.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die neuronale Entwicklung sowohl im embryonalen als auch im postnatalen Status radiosensitiv ist und dass eine funktionale DNS DSB-Reparaturmaschinerie maßgebend für die einwandfreie Entwicklung und Funktion des neuronalen Netzwerkes ist.

2 Summary

Low-dose ionising radiation is frequently used in medical imaging and plays a crucial role in diagnostics. Computer tomographic examinations with low-dose X-rays are performed, especially on toddlers. In these connections, the head is the most frequently examined body part. Besides this, ionising radiation is used as a therapeutic agent against tumors. In addition, people are exposed to natural radiation during air and space travel. These are important reasons to study the effects of ionising radiation on the organism. The focus in this work is the analysis of radiation effects on the neuronal network. A direct and serious damage of ionising radiation is the induction of DNA double strand breaks (DSBs). Proliferating cells, such as stem cells, have two main repair pathways to repair DNA DSBs: homologous recombination (HR) and non-homologous end joining (NHEJ). Differentiated cells such as neurons and glial cells are dependent on the frequently defective repair pathway NHEJ. DNA DSBs which are not or incorrectly repaired lead to senescence, apoptosis or degenerated cells. These factors can support the pathogenesis of Alzheimer's-, Parkinson's- disease and tumor formation.

To investigate the influence of a non-functional HR on radio sensitivity in the developing neural network, the HR-deficient *Rad54*^{-/-} mouse model was chosen. The animals were irradiated with 500 mGy during neurologically disturbance-sensitive phases E14.5 and p10. Two months later, in adult stage, motor skills and exploration behaviour were analysed. Interestingly, the comparison with wild type animals exhibits that not only the irradiated *Rad54*^{-/-} mice show impaired learning behaviour in the Morris Water Maze-test, but also the sham irradiated control mice. Motor skills and exploration behaviour, which were assessed by the *RotaRod*- and *Elevated Zero Maze*-tests, are not affected. Furthermore, it was found that there is a negative correlation between the specific deficit in complex spatial learning and the number of doublecortin (DCX)-positive cells in the *dentate gyrus* of *Rad54*^{-/-} mice. Because DCX is a marker for young neurons, the results suggest that impaired complex allocentric navigation is due to deranged adult neurogenesis.

In the second part of this work, NHEJ-repair in different neuronal cell types was analyzed. For this purpose, the *in vitro* stem cell line J1 was differentiated to homogeneous descendant cultures of neurons, astrocytes and oligodendrocytes. This allowed each cell type to be independently tested for radio sensitivity. The repair of radiation-induced DNA DSBs was observed by immunofluorescence staining of the repair protein 53BP1. It was found that a dramatically slowed down repair of DNA DSBs in neurons after irradiation with 500 mGy. In addition, the low-dose irradiation leads to a reduction of electrical spontaneous activity. The spontaneous activity was determined by deriving the voltage changes in the homogeneous neuron culture in a multi-electrode array. Interestingly, overnight

treatment with the excitatory neurotransmitter glutamate significantly increases the repair efficiency of radiation-induced DNA DSBs in neurons. Additionally, glutamate protects the neural network from radiation-induced dysfunction. This effect could be attributed to the fact that agonists of the glutamatergic system, by binding to specific NMDA-receptors, induce a signalling pathway which is exclusively found in neurons. This signalling pathway leads to the activation of topoisomerase II-beta and consequently to the transcription of immediate early genes. These enhance the DNA damage response and thus have a neuroprotective effect.

Overall, it could be shown that neuronal development, both in embryonic and postnatal status, is radiosensitive and that a functional DNA DSB repair is essential for the proper development and function of the neural network.

3 Einleitung

Seit einigen Jahrzehnten ist bekannt, dass hoch dosierte ionisierende Strahlung zu gravierenden Schäden am Organismus führen kann. Dies konnte sowohl durch eine Reihe epidemiologischer Studien von Atombombenüberlebenden in Hiroshima und Nagasaki, als auch durch Tierversuche eindeutig festgestellt werden. Folgen einer hohen Strahlenbelastung sind unter anderem die Entwicklung von Krebsgeschwüren, Herz-Kreislaufkrankungen und Missbildungen¹. Ionisierende Strahlung in niedrigen Dosen gilt hingegen seit über einem Jahrhundert als nützliches Werkzeug in der Medizin. Mit Hilfe der Röntgenstrahlung wurden insbesondere im bildgebenden Bereich große Fortschritte seit Ende des 19. Jahrhunderts gemacht. In den letzten Jahrzehnten konnte die Technik so weit verfeinert werden, dass nur noch sehr geringe Strahlendosen nötig sind, um ein genaues Abbild der inneren Struktur des Körpers zu erlangen². Die Computertomographie (CT) kommt mit Strahlendosen unter 100 mGy aus. Zuletzt wurden nach einer Studie in Deutschland 1-6 % aller CT Untersuchungen bei Kindern durchgeführt. Die Hälfte dieser Kinder war zum Zeitpunkt der Untersuchung jünger als 4 Jahre. Das betroffene Körperteil war zu 52 % der Schädel. Obwohl die Strahlenexposition im CT relativ gering ist, kann eine Schädigung des Gehirns hervorgerufen werden. So konnte in einer Studie nachgewiesen werden, dass Männer, die im Kleinkindalter einer Bestrahlung im Kopfbereich (> 100 mGy) ausgesetzt waren, im Erwachsenenalter eine deutliche Verminderung der kognitiven Leistung aufwiesen³. Neuere Studien unterstützen diese Befunde und zeigen, dass selbst niedrige Strahlendosen zum Zelltod von neuronalen Stammzellen führen können. Dabei sind nicht nur wie zuvor angenommen die neuronalen Stammzellen im embryonalen Stadium gefährdet, sondern auch die adulten Stammzellen im postnatalen Gehirn⁴.

3.1.1 Die adulte Neurogenese im Säugerhirn

Schon in den frühen sechziger Jahren konnten in verschiedenen adulten Säugerarten mit Hilfe der 3h-Thymidin-Autoradiographie neu gebildete Neurone nachgewiesen werden⁵. Obwohl daraufhin in weiteren Studien neuronale Vorläuferzellen in erwachsenen Säugerhirnen ausgemacht werden konnten, dauerte es 30 Jahre bis das alte Dogma, dass eine Neubildung von Neuronen nur während der Embryogenese möglich ist, durch die Neuerkenntnis, dass auch im adulten menschlichem Gehirn

¹ Kato 1971; Miller 1969; Otake und Schull 1998.

² Fahimian et al. 2010.

³ Hall et al. 2004.

⁴ Barazzuol et al. 2015; Gatz et al. 2011; Fike et al. 2009.

⁵ Altman 1962, 1963; Smart 1961.

Neurogenese stattfindet, abgelöst wurde⁶. Die adulte Neurogenese ist ein Prozess, an dessen Anfang Stammzellen stehen, die über Proliferation und Migration letztendlich neue Neurone hervorbringen, die sich im vorhandenen System integrieren⁷. Bisher konnten zwei prägnante Orte im Säugerhirn ausgemacht werden, welche für die Neubildung von Neuronen verantwortlich gemacht werden: die subventrikuläre und die subgranuläre Zone. Diese Zonen werden auch zusammenfassend als Stammzellnischen bezeichnet⁸. Neu gebildete Neurone aus der subventrikulären Zone (SVZ) migrieren hauptsächlich anterior Richtung olfaktorischen Bulbus, um sich dort nach der Differenzierung als Interneurone im olfaktorischen System zu integrieren⁹. Besonders wichtig für den Menschen sind jedoch die neuronalen Stammzellen, die in der subgranulären Zone (SGZ) des *Gyrus dentatus* (GD) liegen. Diese Stammzellen (= radiale Gliazellen, Abb. 1 A) entwickeln sich aus Neuroepithelzellen, die während der embryonalen Neurogenese gebildet wurden und bis zum adulten Stadium in den Stammzellnischen residieren. Durch die besondere Umgebung, welche die Stammzellnische schafft, bleiben die Stammzellen in ihrem proliferierenden Stadium bis sie ein aus Wachstums- und Transkriptionsfaktoren bestehendes extrinsisches Signal zur Migration bekommen. Frühe, unreife Neurone, die sich aus radialen Gliazellen entwickeln (Abb. 1 A) werden durch GABA noch depolarisiert. Dies liegt an ihrer hohen intrazellulären Chlorid-Konzentration, die über den Chlorid-Importer NKCC1 aufrechterhalten wird¹⁰. Im späteren Verlauf ihrer Maturation bilden sie funktionelle NMDA-Rezeptoren aus und werden nur noch durch Glutamat Agonisten depolarisiert. GABA wirkt dann, aufgrund der niedrigeren intrazellulären Chlorid-Konzentration, inhibitorisch¹¹. Radiale Gliazellen die aus der subgranulären Zone migrieren und sich über Neuroblasten zu jungen Neuronen entwickeln, besitzen spezielle Eigenschaften, um sich im neuronalen Schaltkreis des Hippocampus zu integrieren. Ihr Schwellenwert für die Induktion von Langzeitpotenzierungen (LTPs) ist besonders niedrig, die Größe der Amplitude des LTPs hingegen besonders groß. LTPs beschreiben den Effekt der langfristigen Verstärkung der synaptischen Übertragung im Hippocampus, über die Aktivierung des NMDA Rezeptors¹². Aufgrund der leichten Induktion eines LTPs in jungen Neuronen, können diese in Konkurrenz mit den bereits integrierten Körnerzellen treten und werden gleichzeitig schneller integriert. Ermöglicht wird diese Erleichterung der LTP-Induktion durch NMDA-Rezeptoren,

⁶ Kaplan und Hinds 1977; Kaplan 1985; Tuszyński und Gage 1995; Eriksson et al. 1998; Gould et al. 1999b; Boldrini et al. 2018.

⁷ Kaneko et al. 2017.

⁸ Alvarez-Buylla und García-Verdugo 2002; Fares et al. 2019; Abbott und Nigussie 2020.

⁹ Ming und Song 2011; Bergmann et al. 2012.

¹⁰ Ge et al. 2008; Tozuka et al. 2005; Ge et al. 2006.

¹¹ Nacher et al. 2007; Overstreet Wadiche et al. 2005.

¹² Frey und Morris 1997; Nicoll und Schmitz 2005; Bliss und Lomo 1973.

die die NR2B Untereinheit besitzen¹³. Diese starke synaptische Plastizität ist ein Schlüsselfaktor für die Bildung von Langzeiterinnerungen und die räumliche Orientierung¹⁴. Die Entwicklung von Neuroepithelzellen zu reifen Neuronen unterscheidet sich in der adulten Neurogenese kaum von der embryonalen Neurogenese¹⁵. Der einzige nennenswerte Unterschied liegt in der Geschwindigkeit der Maturation, die bei der adulten Neurogenese erheblich langsamer verläuft als es bei der embryonalen Neurogenese der Fall ist¹⁶.

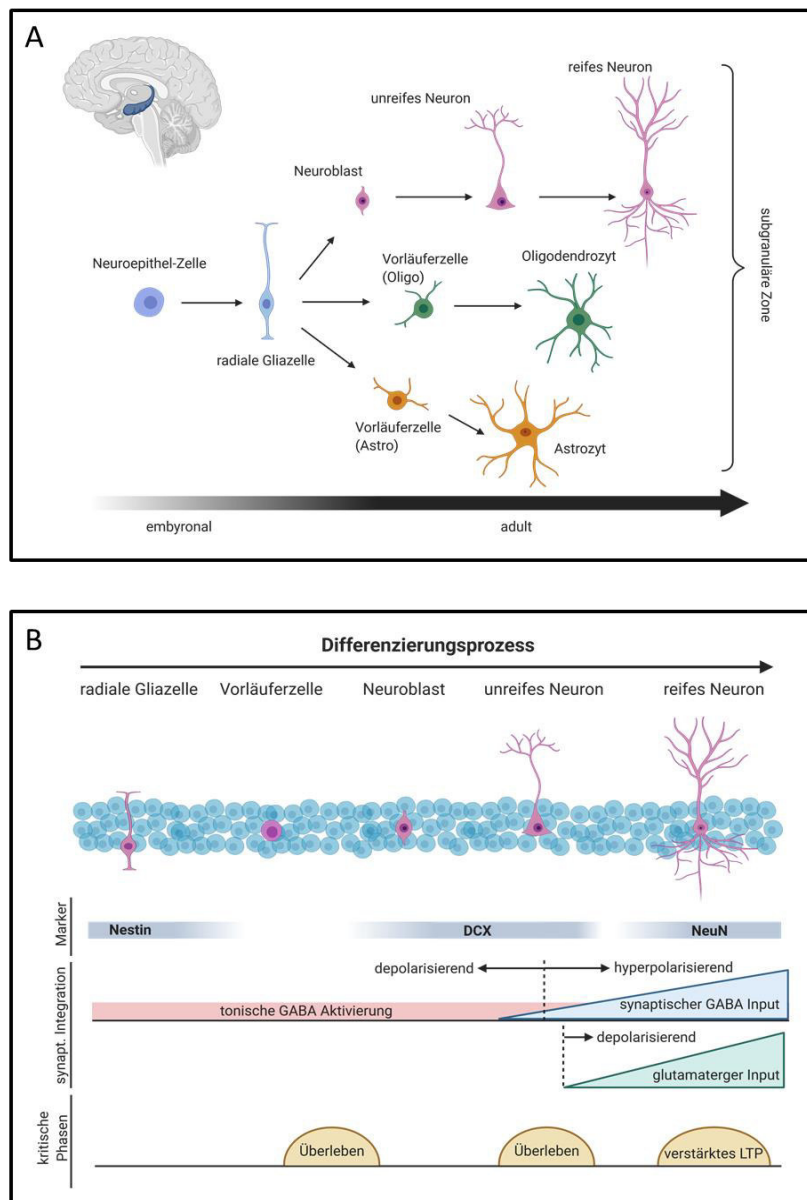


Abbildung 1: Differenzierungspotential radialer Gliazellen und detaillierter Differenzierungsverlauf von Neuronen.
Erstellt mit BioRender.com.

¹³ Tashiro et al. 2006; Toni et al. 2007.

¹⁴ Ge et al. 2007; Espósito et al. 2005; Schmidt-Hieber et al. 2004; Ramirez-Amaya et al. 2006; Kee et al. 2007.

¹⁵ Espósito et al. 2005; Duan et al. 2008.

¹⁶ Overstreet-Wadiche et al. 2006; Zhao et al. 2006.

(A) Differenzierungspotential radialer Gliazelle in der adulten, humanen subgranulären Zone. Während der embryonalen Entwicklung wandeln sich einige der Neuroepithel-Zellen in radiale Gliazellen um. Diese produzieren wiederum Vorläuferzellen für Neurone, Oligodendrozyten und Astrozyten, sowohl während der embryonalen als auch später in der adulten Neurogenese. (B) Während der Differenzierung radialer Gliazellen zu reifen Neuronen durchlaufen die Zellen mehrere Stadien, in denen kritische Phasen das Zellüberleben gefährden und sich die synaptische Integration, als auch die Expression charakteristischer Proteine verändern. Abbildung in Anlehnung an Ming und Song¹⁷.

Die subgranuläre Zone ist darauf ausgerichtet, dass neu gebildete Neurone überleben und sich in den vorhandenen Schaltkreis des Hippocampus integrieren. So geben z.B. Astrozyten eine Reihe von Membranbindungsfaktoren ab, die zur Regulierung der Proliferation, der Migration und der Synapsenbildung von Neuronen essentiell sind¹⁸. Nicht aktivierte Mikrogliazellen sorgen dafür, dass apoptotische Zellkörper neuer Neuronen schnell phagozytiert werden und keinen negativen Effekt auf andere migrierende Neurone haben¹⁹. Interneurone setzen in der Stammzellnische GABA frei, um die Maturation, die Entwicklung der Dendriten und die synaptische Integration von neugebildeten Neuronen zu sichern²⁰. Glutamat reguliert unter anderem über die Aktivierung des NMDAR-Signalweges das Überleben der neu gebildeten Neurone²¹. Trotz der guten Voraussetzungen für ein erfolgreiches Integrieren der neu gebildeten Neurone in das vorhandene Netzwerk, gibt es auf diesem Weg der adulten Neurogenese zwei kritische Phasen für die jungen Neurone. Die erste ist während der Umwandlung von migrierender Vorläuferzelle ins Neuroblastenstadium (Stadium kurz vor unreifem Neuron – noch keine Dendriten ausgebildet, aber DCX positiv) und die zweite während der Integrationsphase des unreifen Neurons zum reifen Neuron (Abb. 1 B). Faktoren, die den Prozess der Neurogenese verändern oder den Verlust von Neuronen oder Gliazellen bewirken, können neurodegenerative Krankheiten wie Alzheimer, Parkinson oder Chorea Huntington auslösen²². Dass wenige Zellen solche Auswirkungen auf die neuronale Verschaltung haben, liegt an der Eigenschaft dieser jungen Neurone, als Modulatoren für eine große Anzahl von reifen Neuronen zu fungieren. Junge Neurone können reife Neurone in ihrer Aktivität stärken, ihre Signale synchronisieren und eine Oszillation im Netzwerk auslösen²³. Junge Körnerzellen bilden Verbindungen über Moosfasern zu Pyramidenzellen der CA3 Region, ebenso wie zu dutzenden Interneuronen, welche wiederum hunderte von reifen Körnerzellen im *Gyrus dentatus* inhibieren können²⁴.

¹⁷ Ming und Song 2011.

¹⁸ Barkho et al. 2006.

¹⁹ Sierra et al. 2010.

²⁰ Ge et al. 2006; Tozuka et al. 2005.

²¹ Tashiro et al. 2006.

²² Akiyama 1994; Price et al. 1986; Braak und Braak 1991; Stout et al. 2011; Hinnell et al. 2012.

²³ Kee et al. 2007; Ramirez-Amaya et al. 2006.

²⁴ Freund und Buzsáki 1996.

Aus den radialen Gliazellen der subgranulären Zone können neben den Neuronen-Vorläuferzellen auch Oligodendrozyten- und Astrozyten-Vorläuferzellen entstehen, welche zu adulten Gliazellen reifen (Abb. 1 A). Die Besonderheit der Oligodendrozyten besteht in ihrer Zusammensetzung und Aufgabe im zentralen Nervensystem. Sie selbst bestehen fast ausschließlich aus dem basischen Myelinprotein (MBP, engl. *myelin basic protein*) und sind dafür verantwortlich, neuronale Axone mit einer Myelinschicht zu ummanteln, um eine schnellere Signalweiterleitung zu ermöglichen. Der Ursprung der Myelinisierung ist noch nicht vollständig geklärt. So kann die Myelinproduktion von Oligodendrozyten selbst initiiert oder durch äußere Signale gesteuert werden. Sicher ist, dass Oligodendrozyten ihre Oberfläche um das 6.500-fache vergrößern und auf diese Weise multiple Axonsegmente myelinisieren können. Aufgrund dessen zeichnen sich Oligodendrozyten durch eine hohe metabolische Aktivität aus, die es erforderlich macht, dass Oligodendrozyten eine enge Verbindung zum vaskulären System haben²⁵. Ein krankhafter Abbau der Myelinisierung, welches symptomatisch für Multiple Sklerose ist, führt zu Lähmungserscheinungen und Fehlkoordination von Signaleingängen im Zentralnervensystem (ZNS)²⁶. Transformationen von Oligodendrozyten stehen im Verdacht der Ursprung von Gliomzellen zu sein²⁷.

Astrozyten sind die zahlenstärksten Zelltypen im zentralen Nervensystem und übernehmen ein weites Spektrum an Aufgaben, um dieses System funktional aufrechtzuerhalten. Neben der strukturellen und metabolischen Unterstützung von Neuronen, erhalten sie die Blut-Hirn-Schranke, regulieren den zerebralen Blutstrom und bewirken durch die Aufnahme von Neurotransmittern ein Ionengleichgewicht im ZNS²⁸. Astrozyten können zudem regulierend auf die Synaptogenese wirken. Dies geschieht durch die Expression von Thrombospondinen und Glypikanen, welche die Neuron-Neuron Interaktion initiieren, oder durch das Entfernen von Synapsen durch Mikroglia²⁹. Eine Fehlfunktion der Astrozyten kann zu Epilepsie und multiplen neurodegenerativen Krankheiten führen³⁰.

3.1.2 Ionisierende Strahlung und ihr Einfluss auf die embryonale und adulte Neurogenese

Die Erkenntnis, dass ionisierende Strahlung fatale Auswirkungen auf das Gehirn haben kann, wurde spätestens nach den Atombombenabwürfen auf Hiroshima und Nagasaki ersichtlich³¹. Vor allem Embryonen, die sich in einer kritischen Phase der Gehirnentwicklung befanden, waren besonders

²⁵ Lee et al. 2012.

²⁶ Fancy et al. 2011.

²⁷ Liu et al. 2011.

²⁸ Stevens et al. 2007; Freeman 2010.

²⁹ Allen et al. 2012; Christopherson et al. 2005; Kucukdereli et al. 2011.

³⁰ Phatnani und Maniatis 2015; Coulter und Steinhäuser 2015.

³¹ Shors et al. 2001; Preston et al. 1994; Preston et al. 2007.

betroffen. Die Folgen waren vielgestaltig und reichten von schweren kognitiven Schäden bis hin zum Abort junger Feten³². Dass das junge postnatale Gehirn von Kindern ebenso gefährdet ist durch ionisierende Strahlung Schäden davonzutragen, wurde erst nach Studien über Patienten ersichtlich, welche in ihren frühen Kindheitsjahren eine Strahlentherapie erfahren hatten³³. Seither ist der Disput groß, ob es eine Schwellendosis gibt, die erreicht werden muss, um Schäden im Gehirn hervorzurufen oder ob jede Strahlendosis - sei sie noch so gering - zu einer Veränderung im Netzwerk des Gehirns führen kann. Eine Erforschung dessen ist umso wichtiger, da der Einsatz ionisierender Strahlung besonders im medizinischen Sektor immer weiter zunimmt und wichtiger wird. Röntgenstrahlung ist seit Jahrzehnten ein wichtiges Werkzeug bei der Bekämpfung von Gehirntumoren. Problematischerweise führt die Bestrahlung des juvenilen und des adulten Gehirns häufig zu neurodegenerativen Entwicklungen, die erst Monate oder Jahre nach der abgeschlossenen Strahlentherapie zutage treten³⁴. Prozesse die im Hippocampus verschaltet werden, so wie das Lernen, die Generierung von Erinnerungen und räumliche Orientierung, sind besonders betroffen. Ein Großteil der Patienten, die erfolgreich durch eine Strahlentherapie genesen, entwickelten im späteren Leben eine Demenz³⁵. Strahleninduzierte Lerndefizite haben in Mausmodellen häufig ihren Ursprung in einer verminderten Proliferation und einer erhöhten Apoptoserate im Hippocampus sowie einer Verminderung der adulten Neurogenese³⁶. Die adulte Neurogenese spielt eine wichtige Rolle für die normale Funktion des Hippocampus, weshalb strahleninduzierte Veränderungen der Neurogenese zu schweren kognitiven Beeinträchtigungen führen³⁷.

3.1.3 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es in einem *in vitro* und *in vivo* Modellsystem die kurz- und langfristigen Effekte niedrigdosierter Strahlung auf das neuronale Netzwerk zu untersuchen und einen Beitrag zur Risikoabschätzung zu leisten. Im Vordergrund stand dabei der folgenreichste Effekt der Röntgenstrahlung, die Induktion von DNS Doppelstrangbrüchen. Diese unmittelbaren Folgen einer Röntgenbestrahlung sollten in unterschiedlichen neuronalen Zelltypen untersucht werden. Dafür bot sich die murine, neuronale Stammzelllinie J1 an. Dieses minimalistische *in vitro* Zellsystem ermöglicht es neuronale Stammzellen in homogene Deszendentskulturen zu differenzieren. So konnte die Induktion und die Reparatur von strahleninduzierten DNS DSBs in Neuronen, Astrozyten und

³² Otake und Schull 1984; Ron et al. 1982.

³³ Ron et al. 1982; Hall et al. 2004; Sadetzki et al. 2005.

³⁴ Surma-aho et al. 2001; Roman und Sperduto 1995.

³⁵ Crossen et al. 1994; Abayomi 1996; Lee et al. 1989.

³⁶ Tada et al. 2000.

³⁷ Hodges et al. 1998; Sienkiewicz et al. 1994; Snyder et al. 2001; Shors et al. 2001.

Oligodendrozyten einzeln und unabhängig voneinander betrachtet werden. Mit einer Bestrahlungsdosis von 500 mGy und der Detektion des Reparaturproteins 53BP1 sollten Induktion und Reparatur von DNS DSBs in den Zelltypen verfolgt werden. Strahleninduzierte DNS DSBs sind komplexe Brüche³⁸, die bei fehlerhafter oder unvollständiger Reparatur die Genomstabilität der Zelle gefährden. Eine Genominstabilität kann zu entarteten Zellen führen, die den Ursprung bösartiger Geschwüre bilden³⁹. Ebenso kann eine gefährdete Genomintegrität zum Zelltod führen⁴⁰. Der Verlust eines Großteils von Neuronen führt zu neurodegenerativen Krankheiten wie Alzheimer oder Parkinson⁴¹. Aufgrund dessen ist eine geeignete Reparatur dieser komplexen DNS DSBs unerlässlich. Postmitotische Zellen wie ausdifferenzierte Neurone und Gliazellen sind hauptsächlich auf die nicht-homologen Endverknüpfung (NHEJ) angewiesen, während mitotischen Zellen, wie den neuronalen Stammzellen, prinzipiell ein weiterer Reparaturweg, die homologe Rekombination (HR), zur Verfügung steht⁴². Wie wichtig eine intakte DNS DSBs-Reparatur ist und welche langfristigen Folgen entstehen können wenn diese Reparatur beeinträchtigt ist, sollte *in vivo* mit dem HR-defiziente Mausmodell Rad54^{-/-} untersucht werden. Zusätzlich sollte eine Bestrahlung der Rad54^{-/-} Mäuse, mit 500 mGy, zu den Entwicklungszeitpunkten E14.5 und p10, darüber Aufschluss geben wie verheerend die Folgen von Röntgenstrahlung auf das sich entwickelnde Gehirn sind, wenn ein wichtiger DNS DSB-Reparaturweg beeinträchtigt ist. Überprüft wurde dies mit dem räumlichen Lern- und Gedächtnistest *Morris Water Maze*.

³⁸ Ward 1988.

³⁹ Khanna und Jackson 2001.

⁴⁰ McKinnon 2013.

⁴¹ Price et al. 1986; Bender et al. 2006.

⁴² Mao et al. 2008.

4 Kapitel I: Langfristige Folgen niedrigdosierter Röntgenstrahlung auf das HR-defiziente Mausmodell Rad54^{-/-}

4.1 Einleitung Kap I

4.1.1 Der Hippocampus und die Auswirkung ionisierender Strahlung auf seine Funktion

Lange Zeit galt das adulte Gehirn als strahlenresistent. Diese Hypothese leitete sich von dem Paradigma ab, dass sich im postnatalen Gehirn keine proliferierenden Zellen mehr befinden, die besonders strahlensensitiv sind. Erst durch den Nachweis der adulten Neurogenese wurde dieses Paradigma revidiert und die eigentliche Strahlensensitivität einiger Areale im Gehirn aufgedeckt⁴³. Ein solch strahlensensitives Areal ist die subgranuläre Zone, in welcher Stammzellen residieren, die den Ursprung aller neu generierten Neurone im *Gyrus dentatus* des Hippocampus bilden⁴⁴. Moderate bis hohe Strahlenbelastungen, die z.B. während einer Tumorthherapie auftreten, führen insbesondere bei Kindern zu kognitiven Beeinträchtigungen⁴⁵. Solche Beeinträchtigungen zeigen einen vielfältigen Charakter, der allerdings häufig im Zusammenhang mit den Funktionen des Hippocampus in Verbindung steht, zu welchen die Gedächtnisbildung, das Lernen und die räumliche Informationsverarbeitung gehören⁴⁶. Besonders proliferierende Stammzellen und junge Vorläuferzellen sind bei einer Dosisleistung zwischen 0,4 Gy und 18 Gy gefährdet abgetötet zu werden⁴⁷. Neben der Apoptose wurden allerdings auch eine ganze Reihe anderer Folgen ionisierender Strahlung dokumentiert, zu denen neben neuroinflammatorischen Prozessen⁴⁸ auch Veränderungen der NMDA-Untereinheiten⁴⁹ sowie die Störung der Redox-Homöostase gehören⁵⁰.

Der Verlust an Stamm- und Vorläuferzellen, die Veränderung des Nischenmilieus und die Störung der Signalweiterleitung adulter Neurone im Hippocampus führen zu einer Beeinträchtigung des Lernverhaltens⁵¹. Neu erworbenen Informationen, die im Hippocampus verarbeitet und als Erinnerung im Langzeitgedächtnis abgespeichert werden, können nicht mehr abgerufen werden. Interessanterweise ist das Arbeitsgedächtnis nicht davon betroffen, genau so wenig wie

⁴³ Altman 1962; Kaplan und Hinds 1977.

⁴⁴ Gage 2000.

⁴⁵ Abayomi 1996; Roman und Sperduto 1995; Lunsford und Kondziolka 2001.

⁴⁶ Raber et al. 2004; Rola et al. 2004; Madsen et al. 2003; Winocur et al. 2006.

⁴⁷ Mizumatsu et al. 2003; Nagai et al. 2000b; Tada et al. 2000; Sasaki et al. 2000; Peissner et al. 1999.

⁴⁸ Monje et al. 2003.

⁴⁹ Shi et al. 2006.

⁵⁰ Rola et al. 2007.

⁵¹ Winocur et al. 2006; Alam et al. 2018; Shors et al. 2001.

Erinnerungen, die vor der Schädigung des Hippocampus erworben wurden⁵². Auch die räumliche Orientierung ist Teil des Verschaltungsprozesses im Hippocampus. So können Menschen, die an einem nicht funktionalen Hippocampus leiden, sich mit Hilfe von Karten und Anhaltspunkten in einer neuen Umgebung orientieren, allerdings nur so lange wie sich die Informationen im Arbeitsgedächtnis halten können. Sobald Langzeiterinnerungen formiert werden müssen, um ein bestimmtes Ziel zu finden, ist es ihnen nicht mehr möglich, sich zu orientieren⁵³. Insbesondere für Tiere ist die Verschaltung im Hippocampus essentiell für die räumliche Orientierung. So können Ratten mit einem defekten Hippocampus im *Morris Water Maze* zwar eine spezifische Route erlernen, die Navigierung zu einem sich örtlich verändernden Ziel oder ausgehend von einer sich ändernden Startposition, ist ihnen nicht möglich⁵⁴. Gesunde Nager erstellen, unterstützt vom Hippocampus, eine kognitive Landkarte des *Water Maze*, um über verschiedene mögliche Routen das Ziel (versteckte Plattform) zu erreichen. Nager mit geschädigtem Hippocampus können sich entweder *per se* den Aufenthaltsort der Plattform nicht merken, weil sie die Information nicht mehr abrufen können, oder ihnen fehlt die Flexibilität der Navigation, da es ihnen nicht möglich ist, eine präzise kognitive Landkarte zu erstellen.

Die Fähigkeit eine präzise, kognitive Landkarte erstellen zu können, hängt insbesondere von den sogenannten Ortszellen des Hippocampus ab. Diese Zellen senden Signale aus, sobald sich das Tier an einem bestimmten Ort aufhält⁵⁵. Unterschiedliche Ortszellen feuern Signale an unterschiedlichen Orten, sodass der Aufenthaltsort des Tieres allein durch das Aktivitätsmuster dieser Ortszellen ausgemacht werden kann⁵⁶. Die Spezifikation der Ortszellen aus der CA1 Region wird unterstützt durch den Signaleingang von Neuronen aus der CA3 Region⁵⁷. Im medialen entorhinalen Cortex residieren Neurone, die ebenso räumlich selektiv aktiv sind, wobei diese Neurone an mehreren Feldern Signale feuern, während die Ortszellen immer nur ein einziges Feld bedienen⁵⁸. Die Aktivitäten dieser Neurone beschreiben ein hexagonales Gitter und die Gesamtheit aller Gitterstrukturen kartographieren den Raum, in dem sich das Tier befindet⁵⁹. Jede dieser sogenannten Gitterzellen hat einen leicht unterschiedlichen Satz von x,y-Koordinaten in der Umgebung, sodass die

⁵² Squire et al. 2004.

⁵³ Urgolites et al. 2016; Shrager et al. 2007; Teng und Squire 1999.

⁵⁴ Morris et al. 1982; Eichenbaum et al. 1990; McDonald und White 1994.

⁵⁵ O'Keefe und Dostrovsky 1971; Eichenbaum 2015; O'Keefe und Nadel 1978.

⁵⁶ O'Keefe 1976; Wilson und McNaughton 1993.

⁵⁷ Brun et al. 2002.

⁵⁸ Fyhn et al. 2004; Hargreaves et al. 2005.

⁵⁹ Hafting et al. 2005.

gesamte Umgebung von einer kleinen Anzahl von Gitterzellen abgedeckt werden kann (Abb. 2)⁶⁰. Im dorsalen Bereich des entorhinalen Cortex beschreiben die Gitterstrukturen kleine Felder, die dicht beieinander gepackt sind. Dabei gilt: je ventraler der Bereich des Cortex liegt, desto expandierter ist der Maßstab der Felder der Gitterstrukturen⁶¹. Das Besondere an den Gitterzellen ist, dass sie ihre spezifische hexagonale Feuerrate unabhängig von Bewegungsgeschwindigkeit und -richtung beibehalten. Im entorhinalen Cortex werden demnach gleichzeitig Informationen zu Bewegungsgeschwindigkeit und Richtung verarbeitet, um die Gitterstruktur dynamisch anpassen zu können. Ermöglicht wird das durch die Aktivität der Kopfrichtungszellen und der Geschwindigkeitszellen⁶². Zusammen bilden die Systeme aus entorhinalen Cortex und Hippocampus das Navigationszentrum in Säugern.

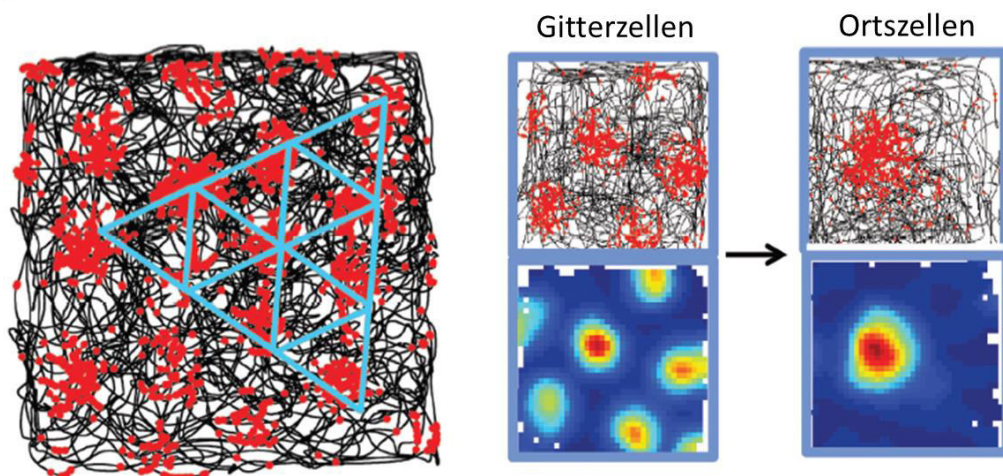


Abbildung 2: Gitter- und Ortszellen des Hippocampus und des entorhinalen Cortex.

(Links) Feuermuster einer Gitterzelle im entorhinalen Cortex. Die schwarze Spur entspricht dem Laufpfad einer Ratte in einem 1,5 m (Durchmesser) großen Quadrat. Jeder rote Punkt entspricht einer Feuerung der Gitterzelle. Werden die Punkte an denen die Gitterzelle reagiert hat miteinander verbunden, ergibt sich eine regelmäßige hexagonale Struktur. (Rechts, oben) Feuermuster einer Gitter- bzw. Ortszelle. (Rechts, unten) Farbkodierte Feuerratekarte, rote Flächen weisen auf eine hohe Aktivität hin, blaue auf eine niedrige. Gitterzellen gelten als die Hauptversorger an räumlichen Informationen für die Ortszellen. Abbildung verändert nach Moser et al. 2015⁶³.

4.1.2 Die Rolle von Rad54 während der homologen Rekombination und die Auswirkungen eines *knock out* im Mausmodell

In Säugetierzellen spielt besonders die nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ, *engl. non homologous end joining*) eine wichtige Rolle bei der Reparatur von strahleninduzierten DNS Doppelstrangbrüchen. Grund dafür ist, dass die NHEJ-Reparatur während des gesamten Zellzyklus

⁶⁰ Moser et al. 2014.

⁶¹ Brun et al. 2008.

⁶² Boccara et al. 2010; Sargolini et al. 2006; Kropff et al. 2015.

⁶³ Moser et al. 2015..

eingesetzt werden kann⁶⁴. Während der frühen Entwicklung von Säugern befindet sich der Großteil an Zellen allerdings im proliferierenden Zustand und damit vermehrt in der S und G2 Phase, daher spielt zu diesem Zeitpunkt die homologe Rekombination (HR) eine besonders große Rolle⁶⁵. Die HR-Reparatur ist zwar in ihrem Einsatz beschränkt, da zur DSB-Reparatur ein Schwesterchromatid als Template zur Verfügung stehen muss, dafür ist die Reparatur von DNS DSBs über den HR-Weg akkurater als über den NHEJ-Reparaturweg. Falsch eingebaute Basen treten während der HR-Reparatur kaum bis gar nicht auf⁶⁶. Die Genauigkeit der HR ist besonders wichtig während Entwicklungsphasen, in denen sich viele Zellen sehr schnell teilen und ein Großteil des Genpools transkribiert werden muss⁶⁷. Postmitotische Zellen die nicht mehr proliferieren reparieren DNS DSBs hauptsächlich über den NHEJ-Weg. Vorteil dieses Reparaturweges ist die Schnelligkeit mit der DNS DSBs repariert werden, Nachteil ist die höhere Fehleranfälligkeit im Vergleich zur HR⁶⁸. Allerdings können postmitotischen Zellen, in denen nur noch eine kleine Fraktion des Genoms funktionell aktiv ist, fehlerhaft reparierte DNS-Schäden eher tolerieren⁶⁹. Sowohl in Hefezellen als auch in *Drosophila melanogaster* und Hühnerzellen konnte durch die Entwicklung reparaturdefizienter Mutanten gezeigt werden, dass sich die Reparaturwege NHEJ und HR gegenseitig unterstützen, wenn Beeinträchtigungen in den Systemen auftreten⁷⁰.

Initiiert wird die homologe Rekombination durch die Resektion der geschädigten DNS-Bruchenden, sodass Einzelstränge mit 3'-Überhängen entstehen (Abb. 3). Dieser Schritt ist hoch konserviert und benötigt die Aktivität zahlreicher Nukleasen, zu denen die BLM-Helikase (BLM, *engl. Bloom's syndrome helicase*) der MRN (MRE11-RAD50-NBS1)-Komplex, die Exonuklease 1 (EXO1) und die ATP abhängige DNS Replikations-Helikase (*engl.: DNA replication ATP-dependent helicase*, Abk.: DN2) gehören. Geschützt vor weiteren Resektionsschritten werden die freien Enden durch das Replikationsprotein A (RPA)⁷¹. Eines der Schlüsselproteine während der HR ist das Rad51 Protein. Mit Hilfe von Mediatorproteinen wie BRCA1, BRCA2 (*engl. Breast cancer gene 1, 2*) und Paralogen des Rad51 Proteins -zu denen Rad54 gehört -wird das RPA verdrängt und ein Rad51-ssDNS (= Einzelstrang-DNS)-Nukleofilament gebildet, welches mit einer homologen Sequenz im Genom (Schwesterchromatid oder homologes Chromosom) einen D-loop ausbildet. In diesem D-loop wird

⁶⁴ Kanaar et al. 1998; Chang et al. 2017; Sonoda et al. 2006.

⁶⁵ Ranjha et al. 2018; Ceccaldi et al. 2016; Takeuchi und Nakamura 2014; Orie et al. 2006.

⁶⁶ Sonoda et al. 1999; Rothkamm et al. 2003a.

⁶⁷ Rousseau et al. 2012.

⁶⁸ Mao et al. 2008.

⁶⁹ Essers et al. 2000.

⁷⁰ Kooistra et al. 1999; Siede et al. 1996; Takata et al. 1998.

⁷¹ Symington und Gautier 2011.

die DNS-Synthese aktiviert, welche die fehlenden Nukleotide im Bereich der Bruchstelle ersetzt. Zum Schluss wird der D-loop wieder aufgelöst, entweder durch die Dissoziation des eingedrungenen Stranges (SDSA, *engl. synthesis-dependent strand annealing*) oder durch die Migration eines Stranges der *Holliday junctions* (Struktur die sich bildet, wenn die Stränge zweier DNS Moleküle ausgetauscht werden), welche durch Resolvasen wieder gespalten werden. Dadurch kann es zu einer Übernahme an Sequenzen des homologen Stranges kommen (*engl. crossover*). In den frühen Phasen der Homologen Rekombination sorgt die Interaktion von Rad54 mit Rad51 dafür, dass Rad51 am Einzelstrang der DNS stabilisiert wird⁷². Zusätzlich unterstützt Rad54 die Rekrutierung einer homologen Sequenz durch das Rad51 Protein⁷³. Nach der Bildung eines D-loops, katalysiert Rad54 die Dissoziation des Rad51 Proteins vom dsDNS (= Doppelstrang-DNS) um Platz für die Bindung der DNS-Polymerase zu schaffen⁷⁴. In der späteren Phase der HR bindet Rad54 spezifisch an die *Holliday junctions* und fördert aktiv die ATP-abhängige Migration des Stranges⁷⁵. Darüber hinaus stimuliert Rad54 die Endonuklease Mus81-Eme1 (Mms4), welche die *Holliday junctions* wieder spalten kann⁷⁶.

⁷² Wolner et al. 2003; Mazin et al. 2003.

⁷³ Mazina und Mazin 2004.

⁷⁴ Solinger et al. 2002; Chi et al. 2006; Li und Heyer 2009.

⁷⁵ Rossi und Mazin 2008; Swagemakers et al. 1998; Bugreev et al. 2006.

⁷⁶ Mazina und Mazin 2008; Matulova et al. 2009.

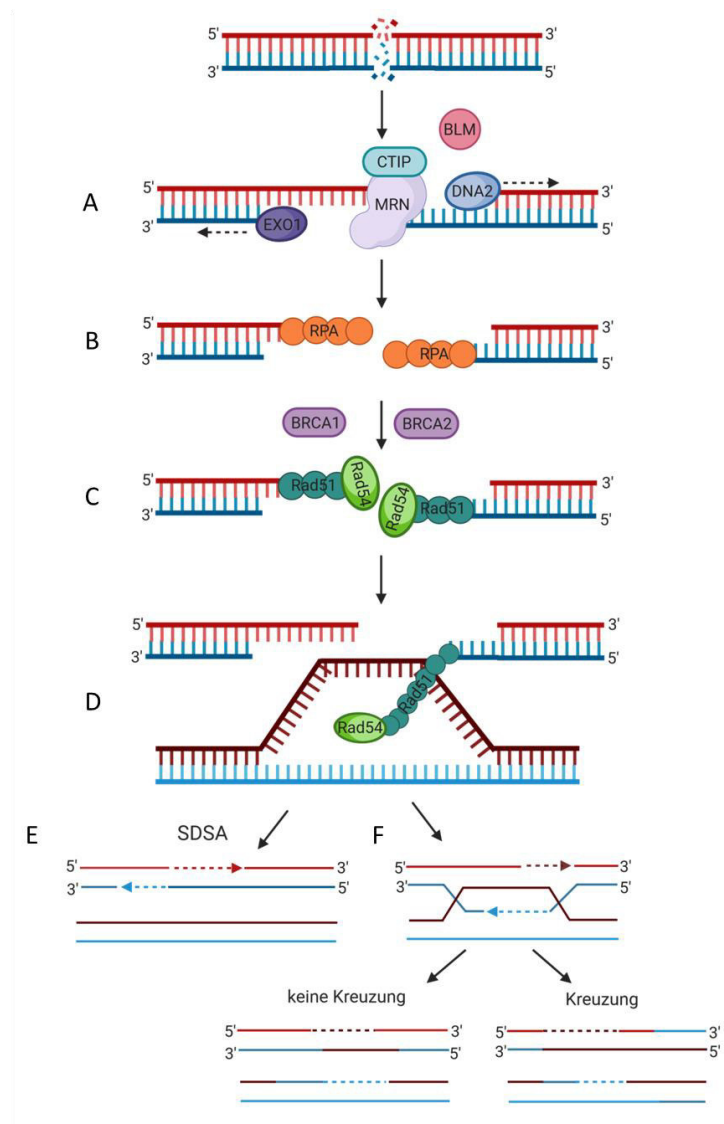


Abbildung 3: DNS Doppelstrangbruchreparatur über die homologe Rekombination. Erstellt mit BioRender.com.

Die HR kann nur während der späten S und der G2 Phase eingesetzt werden, da zu diesem Zeitpunkt ein Schwesterchromatid zur Verfügung steht, das als Reparaturtemplate dienen kann. Initiiert wird die HR durch den MRN-Komplex mit CTIP, sowie eine Reihe von Nukleasen, wie EXO1, DNA2 und BLM, welche einzelsträngige 3' DNS Überhänge generieren (A). Die freiliegenden DNS Enden werden durch RPAs maskiert (B) bis diese von Rad51 und Rad54 verdrängt werden. Die Rekrutierung der Rad-Proteine erfolgt mit Hilfe von BRCA1 und BRCA2 (C). Rad54 unterstützt das gebildete Rad51-ssDNA-Nukleofilament beim Auffinden und Binden einer unbeschädigten homologen Sequenz im Schwesterchromatid. Dabei entsteht ein D-Loop, in welchem die DNS Synthese aktiviert wird, um die fehlenden Basenstücke des DNS Bruchs zu ersetzen (D). Der D-Loop wird entweder durch die Dissoziation des invading Stranges aufgelöst (SDSA, synthesis-dependent strand annealing) (E) oder durch die Bildung von Zwischenprodukten der *double Holliday junctions* (F). Diese werden durch die Endonuklease Mus81-Eme1 gespalten, wobei es zu einer Überkreuzung der Sequenzen der Schwesterchromatiden kommen kann.

Ein Fehlen des Rad54 Proteins führt in embryonalen Mauszellen zu einer erhöhten Strahlensensitivität, welche in adulten Zellen nicht mehr nachgewiesen werden kann⁷⁷. Im Gegensatz

⁷⁷ Essers et al. 2000; Essers et al. 1997.

zu Rad51 *knock out* Mausmodellen sind die Rad54 *knock out* Mäuse nicht embryonal letal⁷⁸. Ohne strahleninduzierten Stress entwickeln die Tiere einen normalen Phänotyp, sie unterscheiden sich mithin weder in ihrem Gewicht noch hinsichtlich ihrer Lebenserwartung vom Wildtyp⁷⁹. Aufgrund dieser Eigenschaften eignet sich das Rad54 *knock out* Mausmodell hervorragend für die Untersuchungen langfristiger, strahleninduzierter Effekte, sowie der Auswirkung einer DNS DSB-Reparaturodefizienz, auf die neuronale Entwicklung.

⁷⁸ Kuznetsov et al. 2009.

⁷⁹ Rousseau et al. 2012.

4.2 Material und Methoden Kap I

4.2.1 Das RAD54^{-/-} Mausmodell

Das RAD54 *knock out* Mausmodell, sollte als DNS reparaturdefizientes-System dienen um den Einfluss ionisierender Strahlung auf das adulte Lernverhalten zu untersuchen. Ionisierende Strahlung führt zu Doppelstrangbrüchen in der DNS⁸⁰. Nicht, oder fehlerhaft reparierte Brüche führen zur Instabilität des Genoms⁸¹, deshalb existieren in der Zelle verschiedene Reparaturmechanismen. Generell gibt es zwei Hauptwege die der Zelle zur Verfügung stehen um DNS Doppelstrangbrüche (DSBs) zu reparieren, die nicht-homologe Endverknüpfung (*NHEJ engl. non homologous end joining*) und die homologe Rekombination (HR)⁸². Welchen Reparaturweg die Zelle verwenden kann, hängt eng mit der Zellzyklusphase zusammen, in der sie sich während der Schädigung befunden hat. Die HR funktioniert nur in der Anwesenheit eines Schwesterchromatids, welches nur in der späten S und G2 Phase vorhanden ist. Zudem ist die Reparatur mit der homologen Rekombination deutlich langsamer im Vergleich zur nicht-homologen Endverknüpfung. Dafür ist der NHEJ-Weg deutlich fehleranfälliger⁸³. Bei den Rad54^{-/-} Mäusen ist die Expression eines Schlüsselproteins während der homologen Rekombination unterdrückt. Bei der homologen Rekombination werden nach Entdeckung eines DNS DSBs die Enden des DSBs resektiert. An den Enden lagert sich das Protein Rad51 mit Rad54 an und es bilden sich Nukleoproteinfilamente, die wiederum im Schwesterchromatid nach komplementären DNS-Sequenzen suchen um das unbeschädigte Schwesterchromatid als Matrize zu benutzen. Für diese Neusynthese der beschädigten DNS muss zuerst das Rad51 Protein wieder von den Enden entfernt werden. Dies wird vom Protein Rad54 katalysiert. Ein Fehlen dieses Proteins kann zu Reparaturdefekten führen⁸⁴. Rad51 *knock out* Mäuse sind embryonal letal⁸⁵, Rad54 *knock out* Mäuse hingegen weisen keinen eklatanten Phänotyp auf. Weder beim Gewicht, noch bei der Größe der Mäuse kann ein signifikanter Unterschied zwischen den Mutanten und den Wildtyptieren festgestellt werden. Auch das Überleben der Tiere ist nicht eingeschränkt und bis zum 5. Lebensmonat zeigen sich auch keine makroskopischen Abnormitäten⁸⁶.

⁸⁰ Ward 1988.

⁸¹ Jackson und Bartek 2009.

⁸² Jackson und Bartek 2009; Rothkamm et al. 2003b.

⁸³ Pfeiffer et al. 2004; Riballo et al. 2004; Brnzei und Foiani 2008.

⁸⁴ San Filippo et al. 2008; Kim et al. 2002; Mills et al. 2004; Kirshner et al. 2009.

⁸⁵ Kuznetsov et al. 2009.

⁸⁶ Essers et al. 1997; Kuznetsov et al. 2009.

Einzig die Fruchtbarkeit scheint bei den Männchen eingeschränkt zu sein, sie weisen eine verminderte Anzahl an Primordialfollikeln auf⁸⁷.

Da das RAD54^{-/-} Mausmodell keine phänotypischen Auffälligkeiten zeigt, wurden in der Zucht für die unter der NTP-ID 00018090-2-4 beschriebenen und genehmigten Tiere nur homozygote Mäuse verwendet.

4.2.2 Genotypisierung der RAD54^{-/-} Mäuse

Um eine homozygote Zucht sicherzustellen wurden alle Zuchttiere einer Genotypisierung unterzogen. Gewebeproben der Tiere wurden nach der Entwöhnung (p23 - 25) durch Ohrmarkierungen entnommen. Die Ohrstanzen wurden mit Lysepuffer [1x Gitschier Puffer, Proteinase K, 0,02 % SDS (*engl. sodium dodecyl sulfate*), ddH₂O] versetzt und über Nacht bei 56 °C und 900 Upm inkubiert. Danach erfolgte eine Erhöhung der Temperatur auf 95 °C für 10 min. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 13000 Upm wurden die Lysate bis zur Durchführung der Polymerasenkettenreaktion bei -20 °C gelagert.

Tabelle 1: Primer Sequenzen der RAD54^{-/-} Genotypisierung

P151 Genotyp RAD54-KO1	5' AGG AAG CAT TTA TTC GAA GTA TTT 3'
P152 Genotyp RAD54-KO2	5' TTT GCT TCC TCT TGC AAA CCA 3'
P153 Genotyp RAD54-15M	5' GTT CAA AGC CAG TCA GCC TAG 3'

Für die Genotypisierung wurden 5 µl Lysat mit 1x PCR Taq Puffer (ohne Magnesium), 1 mM MgCl₂, 0,15 mM dNTP Mix, und je 2 µM Primer versetzt und die Reaktion mit H₂O (Sigma-Aldrich®) aufgefüllt. Zum Schluss wurde in jeden Reaktionsansatz 1U Taq Polymerase pipettiert und die PCR unter folgendem Protokoll durchgeführt (Tab. 2).

Tabelle 2: PCR Protokoll

Schritt	Zeit	Temperatur
1	3 min.	94 °C
2	1 min.	94 °C
3	1 min.	55 °C
4	1 min.	72 °C

}

Schritte 2-4

35 Wiederholungen

⁸⁷ Messiaen et al. 2013.

5	10 min.	72 °C
6	∞	4 °C

Die Produkte aus der abgeschlossenen PCR (*engl. polymerase chain reaction*) wurden mit 6-fachem Ladepuffer auf ein 2 %iges Agarosegel mit ROTI®GelStain (von der Firma Carl Roth) aufgetragen und die Gelelektrophorese (Gene power supply GPS 200/ 400 von der Firma Phramacia) für 90 min. bei 90 V betrieben. Alle Gelbilder wurden mit dem Bildsystem Chemidoc MP der Firma BioRad visualisiert und aufgenommen. Die Wildtypbande setzte sich aus den Primern P151 und P153 zusammen und lief auf einer Höhe von 200 bp, während die *knock out* Bande sich aus den Primern P152 und P153 zusammensetzte und auf einer Höhe von 300 bp lief (Abb. 4).

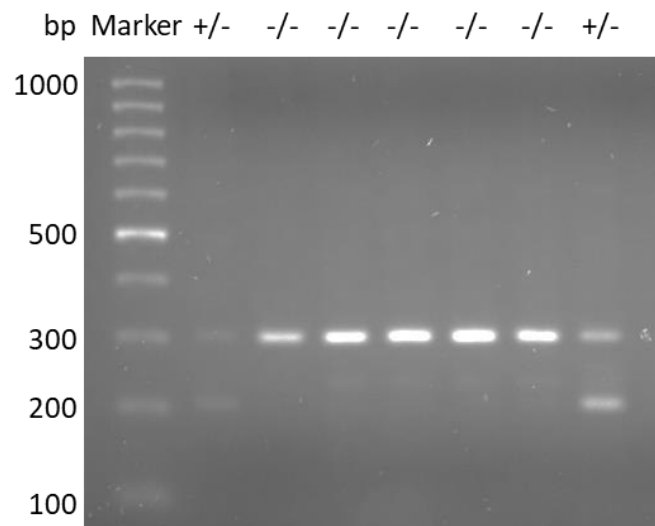


Abbildung 4: Repräsentative Agarosegelaufnahme der Genotypisierung der Rad54 Mäuse.

Um die Basenpaargröße (bp) der PCR-Produkte zu bestimmen wurde ein 100 bp DNS Marker eingesetzt. +/- steht für heterozygote, -/- für homozygote Tiere.

4.2.3 Bestrahlung der RAD54^{-/-} Tiere im E14.5 oder p10 Stadium

Die Bestrahlung der RAD54^{-/-} Mäuse erfolgte an einer Röntgenröhre des Types Isovolt 320 der Firma GE Sensing & Inspection Technologies, bei einer Leistung von 250 kV und 10 mA, einem Abstand von 75 cm zur Strahlenquelle und mit einem 1 mm Alufilter für 29 Sekunden um die absolute Dosisleistung von 500 mGy zu erreichen. Die Dosimetrie wurde mit einem PTW-Weichstrahlkammer-Dosimeter kontrolliert. Das trächtige Muttertier bzw. die zehn Tage alten Tiere wurden einzeln, in eine luftdurchlässige Vorrichtung mit wenig Bewegungsfreiheit überführt und während der gesamten Bestrahlung durch ein Berylliumfenster beobachtet. *Sham* bestrahlte Tiere wurden ebenfalls in die

Röntgenröhre für 29 Sekunden überführt, allerdings ohne einer ionisierenden Strahlung ausgesetzt zu sein.

4.2.4 Motorischer Test *RotaRod*

Der *RotaRod*-Test ist einer der am weitesten verbreiteten Motorkoordinationstests. Zuerst beschrieben wurde er 1957 von Dunham und Miya⁸⁸. Der Vorteil des Tests liegt in seinem automatisierten Aufbau und die fehlende Notwendigkeit eines speziellen Trainings. Beeinträchtigungen im Bewegungsapparat und im Lernen von neuen Bewegungen sind klar auflösbar. Daher findet der *RotaRod*-Versuch besonders Anwendung bei Medikamententests, welche sich auf die neuromuskuläre Koordination richten⁸⁹. In dieser Arbeit ging der Motortest allen anderen Versuchen voraus, um die uneingeschränkte motorische Fähigkeit der RAD54^{-/-} Mäuse sicherzustellen und mögliche Defizite durch die Röntgenbestrahlung aufzudecken.

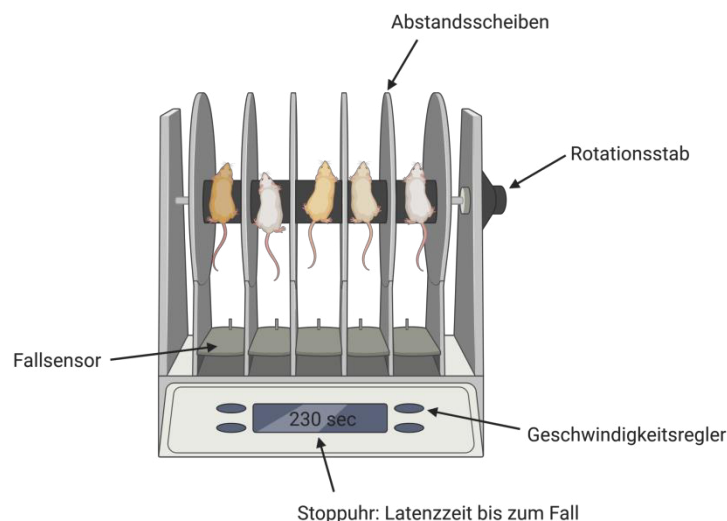


Abbildung 5: Schematischer Aufbau des *RotaRod*-Tests. Erstellt mit BioRender.com.

In mehreren voneinander abgetrennten Bereichen können mehrere Tiere zur gleichen Zeit den Versuch absolvieren. Dabei sitzt jedes Tier auf dem gleichen rotierenden Stab, dessen Rotationsgeschwindigkeit mit einem Regler verstellt werden kann. Ein integrierter Fallsensor registriert, wenn ein Tier sich nicht mehr auf dem Stab halten kann und hinunter fällt, dabei wird zugleich die Zeit gestoppt.

Zur Habituation der Tiere wurden sie 30 min. in ihrem Käfig ungestört gelassen. Danach erfolgte die Gewöhnungsphase, dabei wurden die Tiere für 60 s auf den nicht rotierenden Stab des *RotaRods* gesetzt (Abb. 5). Nach der Gewöhnung erfolgte eine 10 minütige Pause im Käfig. Der zweite Teil der Gewöhnungsphase umfasste zwei Durchgänge, in denen die Tiere auf den leicht rotierenden Stab gesetzt wurden (4 UPM). Fiel in dieser Zeit eine Maus vom Stab so wurde sie wieder auf diesen

⁸⁸ DUNHAM und MIYA 1957.

⁸⁹ Shiotsuki et al. 2010; Hamm et al. 1994; Wei et al. 2016; Kao et al. 2015.

gesetzt und der Versuch wurde fortgesetzt. Nach den Gewöhnungsphasen schloss sich eine 30 minütige Pause im Käfig an. Für den eigentlichen Verhaltenstest wurden die Tiere insgesamt drei Mal auf den Rotationsstab gesetzt und dieser linear von 4 auf 40 UPM beschleunigt. Jeder Test dauerte so lang, wie sich die Maus auf dem rotierenden Stab halten konnte, aber maximal 300 s. Beim Fall vom Rotationsstab lösten die Tiere eine Stoppuhr aus, welche mit dem Fallsensor gekoppelt war. Die aufgenommene Zeit bis zum Fall wurde als Maß für die Motorkoordinationsfähigkeit gewertet. Zwischen jedem Versuchsdurchlauf hatten die Tiere je 15 min. Ruhe in ihrem Käfig.

4.2.5 Elevated Zero Maze (EZM)

Das Elevated Zero Maze ist ein evaluierter Test um das Angst- und Explorationsverhalten bei Nagern zu untersuchen⁹⁰. Zur Habituation wurden die Tiere zunächst 30 min. in ihrem Käfig in Ruhe gelassen. Der Versuch beinhaltete die Verhaltensformen der Tiere auf einer erhöhten ringförmigen Platte zu untersuchen. Diese Platte war in vier Segmente aufgeteilt, die zwei geschlossene und zwei offene Bereiche bildeten. Die Geschlossenen Bereiche waren mit einer 15 cm hohen Umrandung eingegrenzt, während die offenen Bereiche keinerlei Barrieren aufwiesen (Abb. 6).

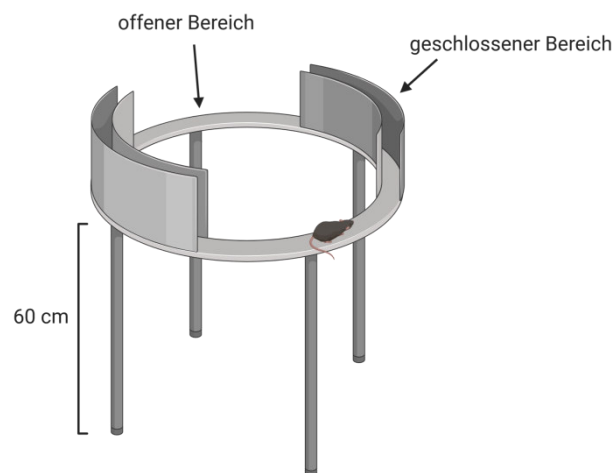


Abbildung 6: Schematischer Aufbau des *Elevated Zero Maze*-Tests. Erstellt mit BioRender.com.

Die ca. 60 cm erhöhte ringförmige Plattform war in zwei geschlossene und zwei offene Bereiche eingeteilt. Die geschlossenen Bereiche waren umgeben von 15 cm hohen Wänden.

Die Tiere wurden 30 min. lang im EZM mittels der Software EthoVision XT nachverfolgt und dann wieder zurück in ihren Käfig überführt. Nach jedem Versuchsdurchlauf wurde das EZM mit Ethanol gereinigt um olfaktorische Spuren der Versuchstiere zu beseitigen. Ausgewertet wurden die

⁹⁰ Tucker und McCabe 2017; Kulkarni et al. 2007; Bell et al. 2014.

Aufenthaltszeiten der Tiere in den offenen und geschlossenen Bereichen, sowie die insgesamt zurückgelegte Distanz.

4.2.6 Morris Water Maze

Das *Morris Water Maze* (MWM) wurde vor fast 40 Jahren entwickelt und ist bis heute einer der am weitesten verbreiteten Tests für die Untersuchung des räumlichen Lernverhaltens bei Nagern⁹¹. Das MWM hat viele Vorteile, so ist weder eine lange Vortrainingsphase noch ein Entzug von Nahrungsmitteln nötig. Seine Zuverlässigkeit spiegelt sich zudem in seiner Unempfindlichkeit gegenüber unterschiedlichen Körpergewichten und Essverhalten der Tiere wieder⁹².

Es existieren verschiedene Protokolle mit unterschiedlichen Schweregraden und Versuchszeiten, jeweils auf das Untersuchungsziel abgestimmt. Prinzipiell besteht das MWM aus einem runden, wassergefüllten Becken, indem unterhalb der Wasseroberfläche eine durchsichtige Plattform platziert wird. An den umliegenden Wänden sind verschiedenartige Symbole angebracht welche als Hinweise dienen. Ziel des Versuchsaufbaus ist es, dass die Tiere in mehreren Trainingstagen die genaue Platzierung der versteckten Plattform mit Hilfe der Hinweise erlernen. Motivation den Ort der Plattform zu erlernen ist das Wasser selbst, denn Mäuse sind keine natürlichen Schwimmer und suchen daher instinktiv einen Weg aus dem Becken.

⁹¹ Morris 1981; Morris et al. 1982; D'Hooge und Deyn 2001; Hall et al. 2004; Lu et al. 2020; Terry, Alvin V. Alvin V. 2009.

⁹² Vorhees und Williams 2014.

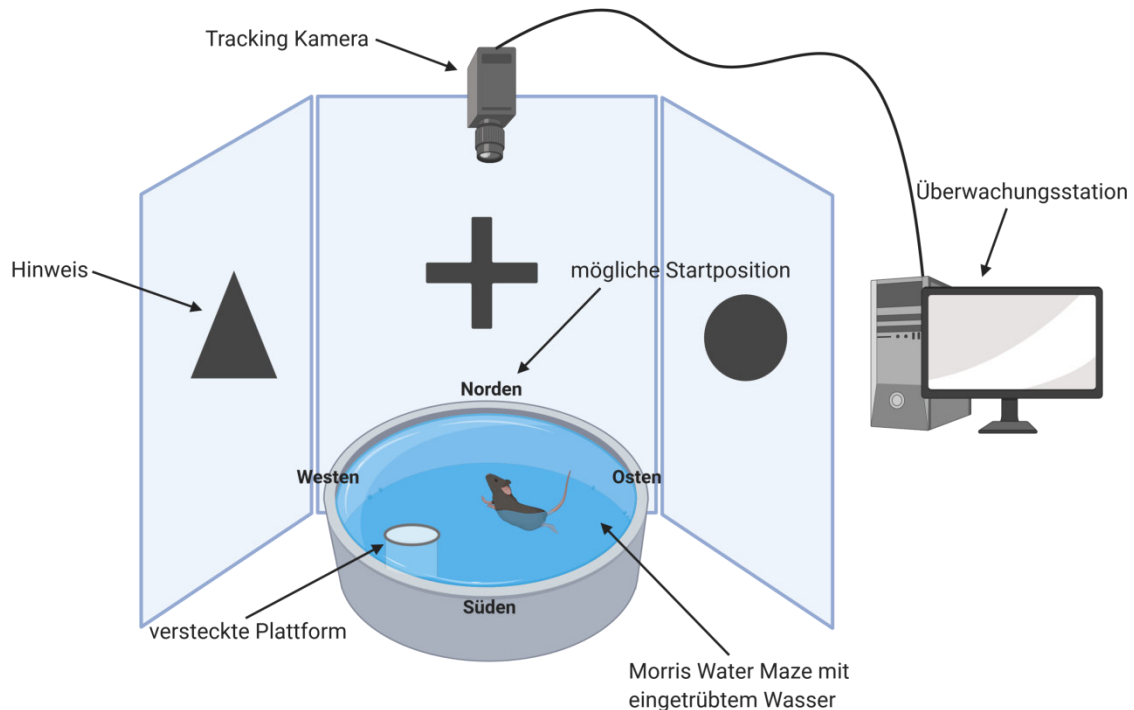


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Morris Water Maze-Tests. Erstellt mit BioRender.com.

Das Wasser des Beckens wurde mit einer ungiftigen Farbe getrübt, damit die Plattform für das Versuchstier nicht sichtbar war. Die Maus konnte sich mit Hilfe der Hinweise an den umliegenden Wänden orientieren und so den Ort der Plattform ausfindig machen. Überwacht wurde der gesamte Test mit einer Kamera und einer Trackingsoftware, die den genauen Aufenthaltsort der Maus mitverfolgte.

In dieser Arbeit wurde ein Becken mit einem Durchmesser von 120 cm gewählt und das Wasser mit einer weißen lebensmittelechten Farbe getrübt. Ein zylinderförmiges Plexiglas wurde darin platziert. Die Plattform des Zylinders hatte einen Durchmesser von 10 cm und lag 1,5 cm unter der Wasseroberfläche des Beckens, sodass sie nicht sichtbar für die schwimmenden Tiere war. An vier Wänden die das Becken umgaben waren einfache geometrische Symbole angebracht, welche als Hinweise dienen sollten. Das Schwimmverhalten der Tiere wurde mit einer an der Decke angebrachten Kamera und der Software EthoVision® XT Version 11.5 der Firma Noldus zeitgleich mitverfolgt (Abb. 7).

Der Morris Water Maze Versuch bestand aus mehreren Phasen und erstreckte sich über zwei Wochen. Am ersten Tag startete zuerst die Gewöhnungsphase, hierbei wurde die Plattform in der Mitte des Beckens ausgerichtet und das Wasser nur soweit aufgefüllt, dass die Plattform ca. einen Zentimeter über der Wasseroberfläche hinausragte. Auf diese Plattform wurde das Tier gesetzt und für 30 Sekunden in Ruhe gelassen. Sprang es in dieser Zeit von selbst von der Plattform und legte einige Zentimeter im Wasser zurück, wurde es wieder auf die Plattform zurückgeleitet, 15 s darauf sitzen gelassen und danach in den Käfig unter eine Wärmelampe gesetzt. Tiere die nicht von allein ins

Wasser sprangen wurden in angemessener Entfernung zur Plattform ins Wasser gesetzt, danach wieder zur Plattform geleitet und 15 s darauf in Ruhe gelassen um dann wieder zurück in den Käfig unter die Wärmelampe zurück geführt zu werden. Die Gewöhnungsphase wurde für jedes Tier dreimal durchgeführt, wobei eine Pause von mind. 15 min. zwischen jedem Durchgang eingelegt wurde.

Nach der Gewöhnungsphase schloss sich direkt die erste Trainingsphase an. Das Wasser im Becken wurde aufgefüllt, bis die Plattform 1,5 cm unter der Wasseroberfläche verschwand, sodass sie im eingetrübten Wasser nicht mehr sichtbar für die Mäuse war. Die Plattform wurde in der ersten Woche der initialen Phase mittig im Südwestquadranten des Beckens ausgerichtet. Jedes Tier durchlief vier Versuche um die Plattform zu finden. Dabei wurde es an verschiedenen Stellen des Beckens mit dem Kopf zur Beckenwand ausgerichtet in das Morris Water Maze gesetzt. Zur Orientierung der Startpositionen dienten kleine Markierungen an der Außenwand des Beckens die die Himmelsrichtungen (Norden, Osten, Süden, Westen) auswiesen. Sechs verschiedene Startpositionen gab es für die erste Trainingswoche: Norden, Osten, Süden, Westen, Süd-Osten und Nord-Westen. Diese Startpositionen wurden jeden Tag gewechselt, sodass sich keine Gewöhnung der Tiere an einen bestimmten Ablauf einstellen konnte. Jeder Versuch die Plattform zu finden dauerte solange bis die Maus mind. 3 Sekunden auf der Plattform sitzen blieb und damit das Tracking der Kamera stoppte. Fand die Maus die Plattform nicht innerhalb von 120 s, wurde sie dorthin geleitet und für 15 s in Ruhe gelassen, damit sie Zeit hatte sich zu orientieren. Nach jedem Versuch hatten die Tiere eine Pause von mind. 20 min. in ihrem Käfig unter einer Wärmelampe. Nach Abschluss aller vier Versuche wurde noch ein visueller Test durchgeführt. Beim visuellen Test markierte eine Fahne die Position der Plattform. Damit sollte ausgeschlossen werden, dass ein Defekt im visuellen System der Tiere, das Erlernen der Plattformposition beeinträchtigte. Die initiale Phase erstreckte sich über 5 Tage. Am sechsten Tag wurde ein Probeversuch durchgeführt. Bei diesem Test wurde die Plattform aus dem Becken entfernt und die Tiere für 60 Sekunden in der Arena schwimmen gelassen. Nach Ablauf der Zeit wurden die Mäuse aus der Arena genommen und unter einer Wärmelampe in ihrem Käfig in Ruhe gelassen. Jedes Tier durchlief den Probeversuch nur einmal.

Am siebten Tag pausierten die Tiere, am achten startete die zweite Phase, die sich ebenfalls über 5 Tage erstreckte und als Umkehrphase bezeichnet wurde. Im Rahmen der Umkehrphase wurde die Plattform mittig des nordöstlichen Quadranten platziert. Der Versuchsablauf unterschied sich nicht zur der initialen Phase, jedes Tier hatte vier Versuche pro Tag um die Plattform zu finden, dabei änderte sich die Startposition mit jedem Versuch und jeden Tag rotierte der Ablauf der Startpunkte. An jedem Tag wurde zuletzt ein visueller Test durchgeführt um die Sehfähigkeit der Tiere zu

überprüfen. Am sechsten Tag folgte ein weiterer Probeversuch, indem die Plattform aus der Arena entfernt wurde und jedes Tier einmal 60 Sekunden im Becken schwimmen musste.

Alle eingesetzten RAD54^{-/-} Tiere stammten aus der homozygoten Zucht (s. Kapitel 4.2.2) und wurden wie unter 4.2.3 beschrieben, bestrahlt. Alle Mäuse waren ca. 8 Wochen alt als sie den *Morris Water Maze*-Test begannen. Alle durchgeführten Verhaltensversuche wurden unter der NTP-ID 00018090-2-4 beschrieben und wurden vom Regierungspräsidium Darmstadt genehmigt.

4.2.7 Auswertung Verhaltensversuche

Die unter 4.2.5 und 4.2.6 beschriebenen Verhaltensversuche wurden zeitgleich mit einer Videokamera aufgenommen und die daraus entstandenen Daten mit der Software EthoVision® XT der Firma Noldus ausgewertet. Der Schwerpunkt lag bei dabei beim Nachverfolgen der Tiere während der gesamten Versuchslaufzeit. Im EZM wurden dabei drei Körperpunkte der Maus getrackt, der Kopf, die Körpermitte und der Schwanzansatz. Diese Daten gaben somit differenziert Aufschluss darüber mit welchem Körperteil sich die Tiere im offenen bzw. geschlossenen Bereichen aufhielten.

Im MWM wurde die Körpermitte des Tieres getrackt und so das Schwimmverhalten aufgezeichnet. Nicht nur die Latenzzeit bis zum Erreichen der Plattform konnte so aufgenommen werden, sondern auch die Aufenthaltszeit in digital eingeteilte Quadranten, der thigmotaktischen und der kritischen Zone. Die Einteilung der Arena in spezifische Zonen war besonders für die Beurteilung des Suchverhaltens der Tiere wichtig (Abb. 8). Richtlinien zur Kategorisierung der Suchstrategien wurden aus der Veröffentlichung von Graziano aus dem Jahr 2003 entnommen⁹³. Dabei gelten die Suchstrategien Direktes Finden (DF), Annäherung zum Ziel (A) und Selbstorientierend (O) als räumliche Suchstrategien, während die Strategien Scannen (S), willkürliches Scannen (WS), Kreisen (K) und Thigmotaxis (T) zu den nicht räumliche Suchstrategien gehören.

⁹³ Graziano et al. 2003.

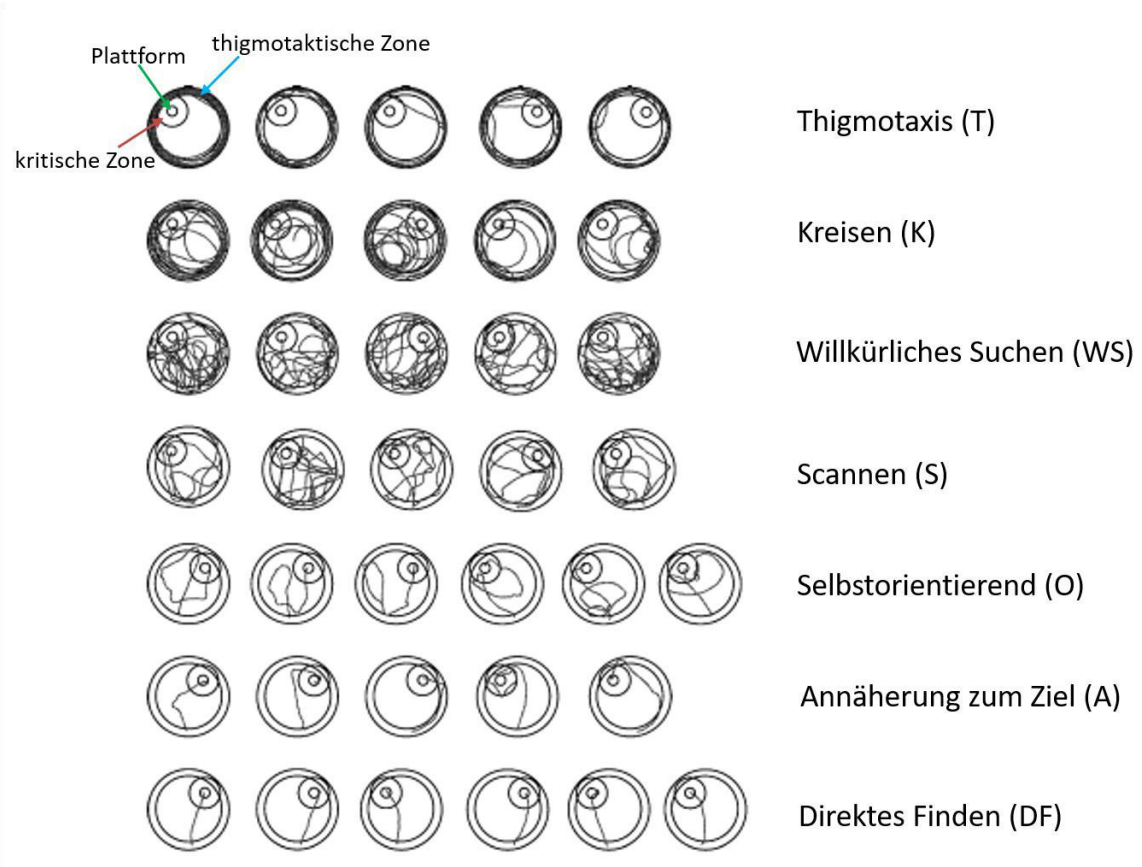


Abbildung 8: Kategorisierung der MWM-Suchstrategien nach Graziano.

Repräsentative Schwimmpfade im MWM. Eingezeichnet sind die Plattform (grüner Pfeil), thigmotaktische (blauer Pfeil) und kritische Zone (roter Pfeil) zur Beurteilung der Suchstrategie. T, K, WS und S zählen zu den nicht räumlichen Suchstrategien; O, A und DF zählen zu den räumlichen Suchstrategien. Abbildung verändert nach Graziano et al. 2003⁹⁴.

4.2.8 Einbettung der RAD54^{-/-} Gehirne

Nach Ablauf aller Verhaltensversuche wurden die RAD54^{-/-} Mäuse perfundiert (Narkose und Perfusion erfolgten unter der Leitung von PD Dr. Andreas Hess an der FAU Erlangen), das Gehirn entnommen und dieses in 15 ml einer 4 %igen PFA-Lösung über Nacht fixiert. Nach dreimaligem Waschen à 15 min. mit PBS wurde das Gewebe durch eine aufsteigende Saccharoselösung stabilisiert. Dabei wurde das Gehirn mit 10 %iger Saccharoselsg. versetzt und über Nacht bei 4 °C inkubiert, bis das Gewebe gesättigt war und zu Boden sank. Daraufhin erfolgte eine Inkubation in 20 %iger Saccharoselsg. bis das Gewebe zu Boden sank und danach in einer 30 %iger Lösung. Nach vollständiger Saccharosesättigung wurde das Kleinhirn und der Bulbus vom Großhirn entfernt und dieses anschließend unter Einsatz von flüssigem Stickstoff und Iso-Pentan in Einbettmedium eingebettet. Bis zum Einsatz am Kryostaten wurde das Gewebe bei -70 °C gelagert.

⁹⁴ Graziano et al. 2003.

4.2.9 Beschichtung der Objektträger

Zur Beschichtung der Objektträger wurde 0,5 % Gelatine und 0,05 % Chrom(III)–kaliumsulfat-Dodecahydrat (Chromalaun) in VE-Wasser gelöst und gefiltert. Die Objektträger wurden je zwei Mal in 70 %igem Ethanol und zwei Mal in ddH₂O geschwenkt um dann ebenfalls zwei Mal in die Gelatine/Chromalaun-Lösung getaucht zu werden. Alle Objektträger wurden über Nacht im Trockenschrank bei 37 °C getrocknet.

4.2.10 Anfertigung der Kryoschnitte

Am Kryostat des Typs Cryostar NX 50 der Firma Thermo Scientific, wurden 12 µm dicke Koronalschnitte der RAD54^{-/-} Maushirne angefertigt. Dafür wurde das bei -70 °C gelagerte Gewebe 30 min. im ca. -23 °C gekühlten Kryostat aufgetaut und auf der Fläche des ehemaligen Kleinhirnes eingespannt. Ein Großteil des Gewebes wurde getrimmt bis die ersten Strukturen des Hippocampus, der Zielstruktur, sichtbar wurden. Ab diesem Zeitpunkt wurden jeweils drei Schnitte für Immunfluoreszenzfärbungen auf einen gelatinebeschichteten Objektträger gezogen danach folgte ein Schnitt für die Nissl-Färbung auf einen separat beschichteten Objektträger. In diesem Schema wurden so viele Schnitte angefertigt bis die Zielstruktur nichtmehr erkennbar war. Die Objektträger wurden bei Raumtemperatur getrocknet und bei -20 °C gelagert.

4.2.11 Nissl-Färbung

Zuerst wurde eine Kresylviolettlösung aus einem Teil Natriumacetat (2,7 %) und vier Teilen Essigsäure (1,2 %) in ddH₂O hergestellt, anschließend wurde der pH auf 3,8 – 4,0 eingestellt. Die auf Raumtemperatur gebrachten Gewebeschnitte aus 4.2.10 wurden zu Beginn der Färbung rehydriert, durch 5 min. Inkubation in EtOH 100 %, 5 min. in EtOH 96 %, 2 min. in 70 % EtOH und 2 min. in ddH₂O. Daraufhin folgte eine 12 - 15 minütige Inkubation in 50 %iger Kaliumdisulfatlösung und ein zweimaliger Waschschrift mit ddH₂O für jeweils 2 min. Die Gewebeschnitte konnten nun in der wasserlöslichen Kresylviolettlösung angefärbt werden. Ein zweiminütiger Acetatpufferinkubationsschritt folgte und eine Differenzierungsreihe, welche aus einer aufsteigenden Alkoholreihe (> 3 min. EtOH 70 %, > 3 min. EtOH 96 %, > 3min. EtOH 100 %) bestand. Zum Schluss wurden die Gewebeschnitte mit Xylol je zwei Mal à 5 Minuten gereinigt, mit dem Eindeckmittel Entellan® beträufelt und mit einem Deckglas eingedeckt. Alle Färbeschritte wurden unter dem Abzug durchgeführt und die fertig eingedeckten Objektträger für zwei Tage bei Raumtemperatur getrocknet.

4.2.12 Immunhistologische Färbung

Vor Beginn der Immunfärbung wurde eine Antigen-Demaskierung durchgeführt, um ein besseres Färbeergebnis zu erhalten. Dafür wurden die Objektträger auf einer Heizplatte aufgetaut und anschließend im Citratpuffer (EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution) bei 93 °C für 45 min. inkubiert. Citratpuffer und Gewebeschnitte kühlten für ca. 20 - 30 min. bei Raumtemperatur ab bevor sich die ersten drei Waschschrte à 10 min. mit PBS (*engl. phosphate buffered saline*) anschlossen. Freie Proteinenden wurden für 45 min. bei Raumtemperatur mit einer Roti®Block Lösung (Roti®Block, 1:10 in ddH₂O + 0,5 % Triton X-100) geblockt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS à 5 min. schloss sich die primäre Antikörperfärbung über Nacht bei 4 °C an. Dafür wurde der Antikörper Doublecortin (DCX, Abcam ab18723) 1:1000 in Blocklösung (Roti®Block, 1:10 in PBS + 0,1 % Triton X-100) verdünnt. Um überschüssigen primären Antikörper abzuwaschen, schlossen sich drei Waschschrte à 10min. mit PBS an. Die sekundäre Antikörperfärbung erfolgte bei Raumtemperatur für eine Stunde mit dem Fluoreszenzfarbstoff AlexaFluor 594 (Thermo Fisher). Dieser wurde 1:1000 in Blocklösung verdünnt (Roti®Block, 1:10 in PBS + 0,1 % Triton X-100). Vor der Färbung mit dem membrangängigen Farbstoff Hoechst 33342 wurden die Gewebeschnitte drei Mal à 10 min. und anschließenden noch zwei Mal à 5 min. mit PBS gewaschen. Hoechst 33342 wurde 1:100 in PBS verdünnt und die Gewebeschnitte damit 10 min. bei RT inkubiert. Drei abschließende Waschschrte à 5 min. mit PBS folgten, bevor die Gewebeschnitte mit dem Einschlussmittel Roti®Mount FluorCare (Carl Roth) beträufelt und einem Deckglas eingedeckt wurden. Die Objektträger wurden über Nacht bei RT trocknen gelassen und danach bei 4°C gelagert.

4.2.13 Auswertung Histologie

Ausgewertet wurde die Anzahl der DCX positiven Zellen in den Gyrus dentati der RAD54^{-/-} Mäuse. Dazu wurden die Gewebeschnitte deren DNS und RNS-Anteile durch die Nissl-Färbetechnik angefärbt wurden im Aperio Image System von Leica Biosystems eingescannt und mit der Software Image Scope x64 visualisiert. Diese Aufnahmen wurden zur Eingrenzung des Bregma-Abschnittes von -1,34 bis -2,46 eingesetzt um die Struktur *Gyrus dentatus* auszumachen. Objektträger die in diesen Bereich fielen wurden für die Immunfärbungen ausgewählt und wie unter 4.2.12 beschrieben, behandelt. Der sekundäre Fluoreszenzfarbstoff AlexaFluor 594 wurde bei einer Wellenlänge von 596 nm angeregt und emittierte das Licht im roten Bereich von 615 nm, während der DNS Farbstoff Hoechst 33342 das Licht im Bereich von 525 nm emittierte. Die Zellkerne der Körnerzellen im *Gyrus dentatus* erschienen demnach blau und die DCX positiven Zellen rot. Einzelne Ausschnitte des *Gyrus dentatus* wurden mit dem 20er Objektiv des Zeiss Axio Observer Z1-Fluoreszenzmikroskops aufgenommen und diese mit

dem Plugin „pairwise stitching“⁹⁵ des Programmes Image J für die Auswertung der Anzahl der DCX positiven Zellen wieder zusammengefügt. Ausgewertet wurden pro Tier, 8 bis 10 Gyrus dentati, welche sich nicht überlappten.

⁹⁵ Preibisch et al. 2009.

4.3 Ergebnisse Kap I

Für die Untersuchungen der Langzeiteffekte von Niedrigdosisstrahlung auf das prä- und postnatale Gehirn, wurde das Mausmodell $\text{Rad54}^{-/-}$ ausgewählt. Wie unter Kapitel 4.2.1 ausführlicher beschrieben, handelt es sich bei den $\text{Rad54}^{-/-}$ Mäusen um ein DNS-Doppelstrangbruch-reparaturdefizientes System, bei welchem die Expression eines Schlüsselproteins der homologen Rekombination unterdrückt ist. DNS-Doppelstrangbrüche (DSBs) sind die folgenreichsten Läsionen die durch ionisierende Strahlung entstehen können. Dennoch weisen die $\text{Rad54}^{-/-}$ Tiere, im Gegensatz zu anderen reparaturdefizienten Modellen, keinen letalen Phänotyp auf. Dies macht sie zu einem guten System zur Untersuchung von Strahlenschäden⁹⁶. Die Mäuse wurden für diese Arbeit im Alter von 10 Tagen bzw. im Embryonalstadium E14.5 mit 500 mGy Röntgenstrahlung bzw. sham bestrahlt und im Alter von zwei Monaten das räumliche Denkvermögen analysiert.

Die Zeitpunkte der Bestrahlung wurden gewählt, da zum einen, besonders Embryonen gefährdet sind durch Röntgenbestrahlung kognitive Schäden zu erleiden⁹⁷. Zum anderem weist das Gehirn auch im jungen postnatalen Alter kritische Phasen auf in denen es besonders strahlensensitiv ist. Strahleninduzierte Schäden im frühen Entwicklungsalter führen zu kognitiven Beeinträchtigungen, die bis zum Erwachsenendasein überdauern können⁹⁸. Für die Analyse des räumlichen Denkvermögens im adulten Stadium, wurde der Verhaltenstest *Morris Water Maze (MWM)* gewählt⁹⁹.

4.3.1 Vergleich der motorischen Eigenschaften und des Explorationsverhaltens der röntgen- bzw. sham bestrahlten $\text{Rad54}^{-/-}$ Mäuse

Bevor die $\text{Rad54}^{-/-}$ Tiere den *MWM*-Test durchlaufen konnten, musste überprüft werden, ob sie die physiologischen Voraussetzungen für diesen erfüllten. Die Motorik der Mäuse wurde mit dem *RotaRod*-Test ermittelt, das Explorationsverhalten der Tiere über den *Elevated Zero Maze-Test (EZM)* (Abb. 9, 10). Die detaillierten Abläufe der Tests sind unter Kapitel 4.2.4 und 4.2.5 beschrieben.

⁹⁶ Essers et al. 1997; Kuznetsov et al. 2009.

⁹⁷ Otake und Schull 1984, 1998.

⁹⁸ Hall et al. 2004; Sadetzki et al. 2005; Ron et al. 1982; Roman und Sperduto 1995.

⁹⁹ Morris 1981.

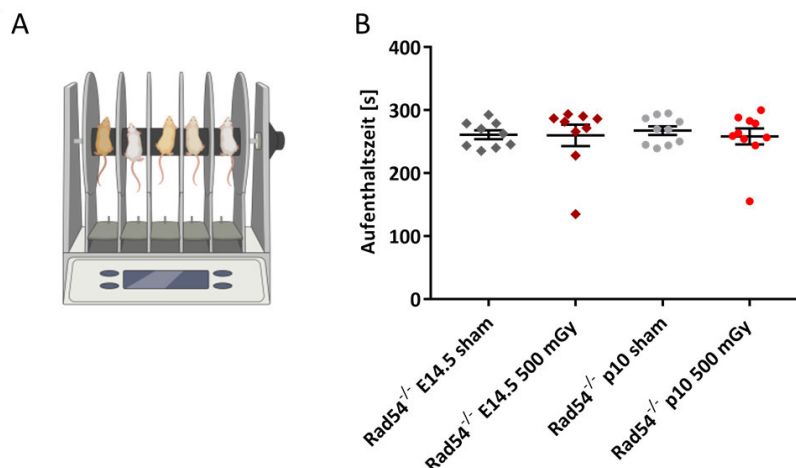


Abbildung 9: Rad54^{-/-} Tiere zeigten keine behandlungsbedingten Auffälligkeiten im RotaRod-Test.

(A) Graphische Darstellung des RotaRod-Tests. (B) Gemessen wurde die durchschnittliche Aufenthaltszeit der Mäuse auf einem sich rotierenden Stab, dessen Geschwindigkeit sich linear erhöhte. Dargestellt ist der Mittelwert aus je drei Versuchen pro Maus mit SEM. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen mit dem Tukey-Mehrfachvergleichstest festgestellt werden. Rad54^{-/-} E14.5 sham n= 9, Rad54^{-/-} E14.5 500 mGy n= 9, Rad54^{-/-} p10 sham n= 10, Rad54^{-/-} p10 500 mGy n= 10.

Im RotaRod-Test konnten keinerlei motorische Auffälligkeiten der Tiere festgestellt werden. Weder die Bestrahlung im embryonalen bzw. frühen postnatalen Stadium beeinträchtigte die motorischen Fähigkeiten der Mäuse, noch das Fehlen des Reparaturproteins Rad54 sorgte für Unregelmäßigkeiten im Bewegungsmuster. Alle Tiere konnten sich in etwa gleich lang auf dem rotierenden Stab halten (Abb. 9 B). Nur bei der Gruppe der 500 mGy bestrahlten Rad54^{-/-} Tiere gab es zwei Ausreißer. Der Ausreißer der E14.5 Gruppe wurde nicht aus dem Versuch genommen, da die geringe Durchschnittszeit nicht auf eine motorische Auffälligkeit, sondern auf einen Fehlversuch während der Testreihe zurückzuführen war, dieses Tier fiel aufgrund seines hohen Explorationsverhaltens beim ersten Versuch vom Stab (Versuch 1= 36 s, Versuch 2= 119 s, Versuch 3= 250 s). Der zweite Ausreißer, aus der p10 500 mGy bestrahlten Gruppe, hielt sich im Schnitt nur etwa halb so lang auf dem rotierenden Stab im Vergleich zum Rest der Gruppe (155,5 s, $\bar{\mu}$ = 258,5 s). Da diese Maus keine motorischen Anomalien aufwies und im EZM-Test nicht wieder auffällig wurde, konnte sie in den weiteren Versuchen mitgeführt werden.

Neben der Motorik wurde auch das Explorationsverhalten der Tiere untersucht. Dafür wurden die Mäuse 30 Minuten auf einer erhöhten kreisförmigen Plattform gehalten und ihre Bewegung verfolgt. Zweck des Tests war es herauszufinden wie häufig die Tiere die geschlossenen und offenen Bereiche des *Elevated Zero Maze* betreten würden. Dafür wurde ihre Körperachse in drei Punkte aufgeteilt: den Nasenbereich, das Zentrum und den Wurzelansatz des Schwanzes. Aufgetragen ist in Abbildung 10 der prozentuale Anteil der Zeit, in der sich die Tiere mit ihrem Nasen- und Mittelpunkt in offenen Bereichen aufhielten, sowie die insgesamt zurückgelegte Distanz. Ein defizientes

Explorationsverhalten würde sich unter anderem darin bemerkbar machen, wenn die Tiere sich nur in geschlossenen und kaum in offenen Bereichen aufhalten würden. Dies konnte allerdings in keiner Gruppe beobachtet werden.

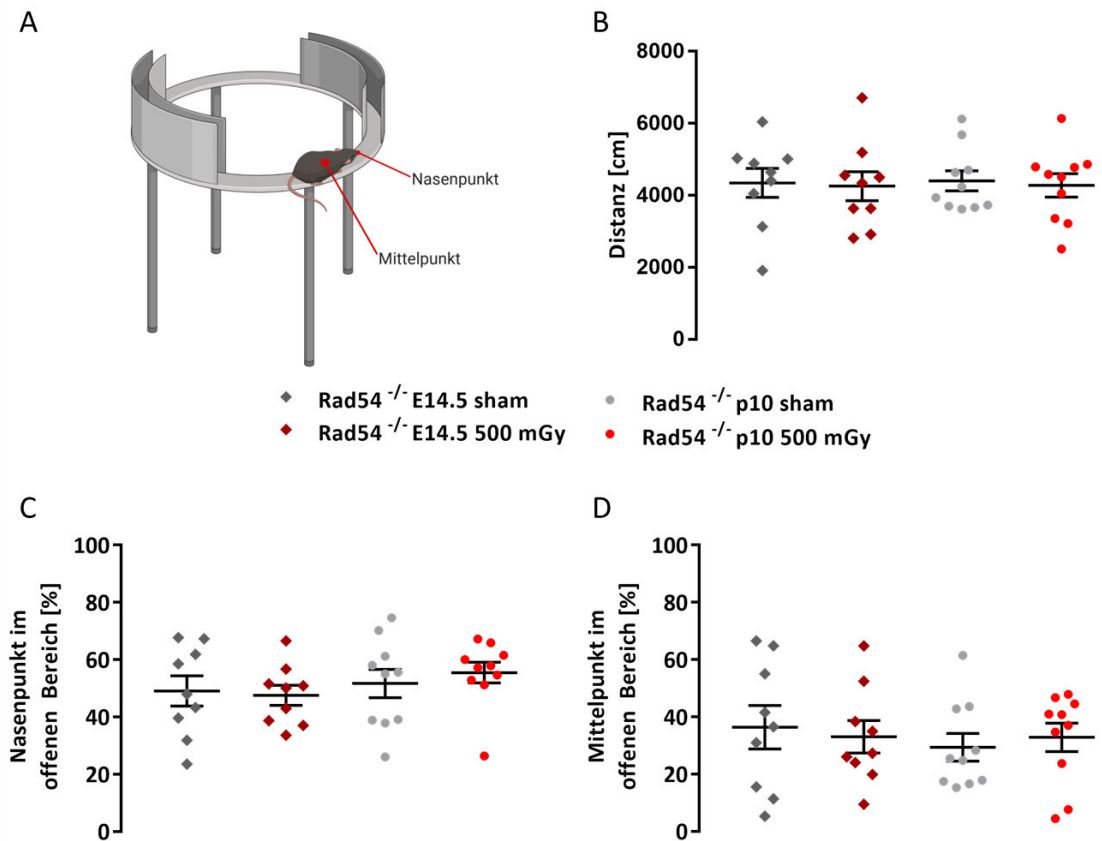


Abbildung 10: Rad54^{-/-} Tiere zeigten keine behandlungsbedingten Auffälligkeiten im EZM-Test.

(A) Schematische Darstellung des EZM. Aufgetragen ist die insgesamt zurückgelegte Distanz (B) sowie die Aufenthaltszeit des Nasenpunktes (C) und des Mittelpunktes (D) in offenen Bereichen während der Testlaufphase von 30 min. (B - D) Die dargestellten Abweichungen vom Mittelwert entsprechen dem SEM. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen mit dem Tukey-Mehrfachvergleichstest ermittelt werden. Rad54^{-/-} E14.5 sham n= 9, Rad54^{-/-} E14.5 500 mGy n= 9, Rad54^{-/-} p10 sham n= 10, Rad54^{-/-} p10 500 mGy n= 10.

Die Analyse des EZM zeigte, dass sich die Rad54^{-/-} Mäuse in ihrem Explorationsverhalten nicht unterschieden. Die Tiere hielten sich sowohl in den offenen als auch in den geschlossenen Bereichen des EZM auf und betraten die offenen Bereiche mit ihrem Nasen- bzw. Mittelpunkt gruppenübergreifend mit dergleichen Häufigkeit (Abb. 10 C, D). Auch die zurückgelegten Distanzen unterschieden sich nicht zwischen den Gruppen (Abb. 10 B).

Da sowohl die motorischen Voraussetzungen erfüllt wurden und ebenso keine Auffälligkeiten im Explorationsverhalten festgestellt werden konnten, folgte anschließend der *Morris Water Maze*-Test.

4.3.2 Vergleich des räumlichen Lernverhaltens der an E14.5 sham und 500 mGy bestrahlten Rad54^{-/-} Tiere

4.3.2.1 Initiale Phase des MWM-Tests

Der *Morris Water Maze*-Test teilte sich in zwei Abschnitte auf. Der erste Abschnitt war die initiale Phase, in welcher die Tiere das Prinzip des Versuches erlernen und daraufhin die nicht sichtbare Plattform im Wasser erreichen mussten. Orientierungspunkte boten insgesamt vier Hinweise, welche an umliegenden Wänden platziert wurden. Die initiale Phase beinhaltete insgesamt 5 Trainingstage in denen jedes Tier pro Tag vier Versuche hatte, um die Plattform zu finden. Während dieses Zeitraumes mussten die Tiere eine Strategie entwickeln, um mit Hilfe der Hinweise zur Plattform zu navigieren. Um sicherzugehen, dass das räumliche Denkvermögen adressiert wurde und nicht das Arbeitsgedächtnis, in welchem eine bestimmte Route erlernt, abgespeichert und immer wieder abgerufen wird, variierten die Startpunkte der Suche. Das bedeutet, dass die Maus für jeden Versuch an einer anderen Stelle in das Wasserbecken gesetzt wurde, allerdings niemals in die unmittelbare Nähe der Plattform.

Im zweiten Abschnitt des *MWM*-Tests, der Umkehrphase, wurde der Aufenthaltsort der Plattform im Wasserbecken verändert. Die Aufgabe der Tiere war es nun, ihre ursprüngliche Suchstrategie zu revidieren und eine neue Taktik anzuwenden, um den neuen Aufenthaltsort der Plattform zu ermitteln. Der detaillierte Verlauf des gesamten *MWM*-Tests ist unter Kapitel 4.2.6 beschrieben.

Ein Vorteil des *MWM*-Tests ist es, dass keine Vortests nötig sind¹⁰⁰. Die Motivation die Plattform zu finden und damit aus dem Becken zu fliehen, liegt in der Natur der Mäuse. Diese sind keine natürlichen Schwimmer und versuchen daher auf schnellstmögliche Weise dem Wasser zu entkommen¹⁰¹. Somit ist das *MWM* unabhängig vom Appetit oder der Trägheit der Tiere. Das Fehlen von Vorversuchen spiegelte sich allerdings im Abschneiden der Tiere am ersten Trainingstag der initialen Phase wider (Abb. 11 A). Die Mäuse erfahren nicht nur eine neue Umgebung, auch der Testverlauf ist eine neue Prozedur, die in erster Linie Stress verursacht. Die Tiere benötigten daher vergleichsweise viel Zeit um die Plattform ausfindig zu machen. Interessanterweise ähnelten sich die Lernkurven der 500 mGy und sham bestrahlten Rad54^{-/-}Tiere sehr. Allerdings zeigten die 500 mGy bestrahlten Mäuse in den ersten zwei Tagen der initialen Phase ein leicht verzögertes Lernverhalten (Abb. 11 A, B). So benötigten sie am zweiten Tag der initialen Phase im Schnitt $97,7 \pm 7,2$ s um die Plattform zu erreichen, die sham bestrahlten Tiere hingegen nur $70,1 \pm 10,4$ s.

¹⁰⁰ D'Hooze und Deyn 2001.

¹⁰¹ Cravens 1974.

Erwartungsgemäß verringerte sich im Laufe der initialen Phase die Zeit, die die Mäuse benötigten um die Plattform zu erreichen (Abb. 11 A - E). Grund für die verbesserten Zeiten war auch der vermehrte Einsatz von räumlichen Suchstrategien (Abb. 11 F). Es konnten keine signifikanten Unterschiede im Einsatz der räumlichen Suchstrategien zwischen den Behandlungsgruppen ermittelt werden. Lediglich Tendenzen waren zu erkennen. So setzten die an E14.5 500 mGy bestrahlten Tiere in den ersten zwei Tagen der initialen Phase im Schnitt nur knapp 3 % räumliche Suchstrategien ein um die Plattform zu erreichen, sechsmal weniger als die sham bestrahlten Tiere (Tag 1+ 2: E14.5 500 mGy= $2,78 \pm 0$ %, E14.5 sham= $18,05 \pm 4,9$ %). Am fünften Tag der initialen Phasen unterschieden sich die 500 mGy und sham bestrahlten Tiere weder im Einsatz der räumlichen Suchstrategien (sham= $52,8 \pm 14,1$ %, 500 mGy= $50 \pm 13,2$ %), noch in der Zeit um die Plattform zu erreichen (\emptyset Zeit: sham= $59,6 \pm 13,3$ s, 500 mGy= $58,6 \pm 14,5$ s) (Abb. 11 E, F).

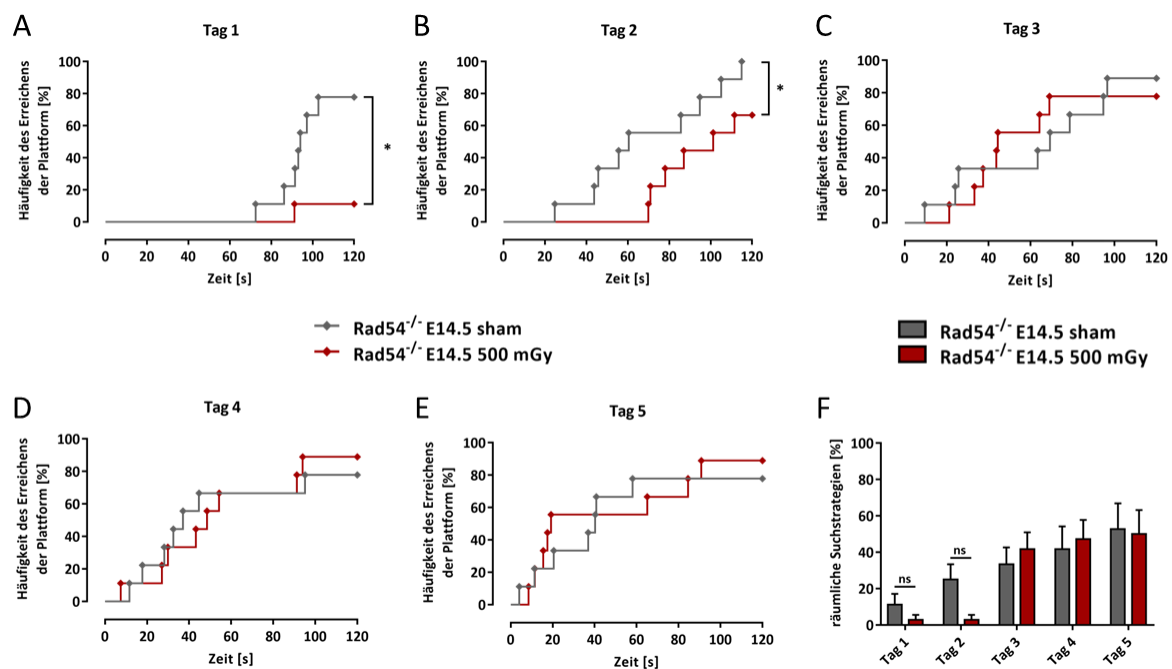


Abbildung 11: Ähnliches Lernverhalten der an E14.5 sham/ 500 mGy bestrahlten Rad54^{-/-} Tiere, während der initialen Phase des MWM-Tests.

(A - E) Aufgetragen ist die Häufigkeit des Erreichens der Plattform und die durchschnittliche Zeit, die dafür benötigt wurde. Jedes Tier hatte pro Tag vier Versuche die Plattform aus unterschiedlichen Startpositionen zu finden, wobei jeder Versuch maximal 120 Sekunden dauerte. Signifikanzen wurden unter Berücksichtigung der Bonferroni Korrektur mit dem Mantel-Cox und dem Gehan-Breslow-Wilcoxon Test festgestellt, $p < 0,05$ (*). (F) Dargestellt sind die durchschnittlich eingesetzten räumlichen Suchstrategien während der initialen Phase. Abweichungen vom Mittelwert entsprechen dem SEM. Signifikanzen wurden mit dem Sidak-Mehrfachvergleichstest ermittelt; $p > 0,1234$ (ns), $p < 0,0332$ (*). Rad54^{-/-} E14.5 sham $n = 9$, Rad54^{-/-} E14.5 500 mGy $n = 9$.

Am sechsten Tag der initialen Phase erfolgte ein Probeversuch. Bei diesem Probeversuch wurde die Plattform aus dem Becken entfernt und das Schwimmverhalten der Tiere innerhalb von 60 Sekunden aufgezeichnet. Gemessen wurde hierbei die Aufenthaltszeit der Tiere in vier virtuell markierten

Quadranten des Beckens (Süd-West, Süd-Ost, Nord-West und Nord-Ost). Zielquadrant bildete der südwestliche, da sich hier die Plattform während der initialen Phase befand (Abb. 12).

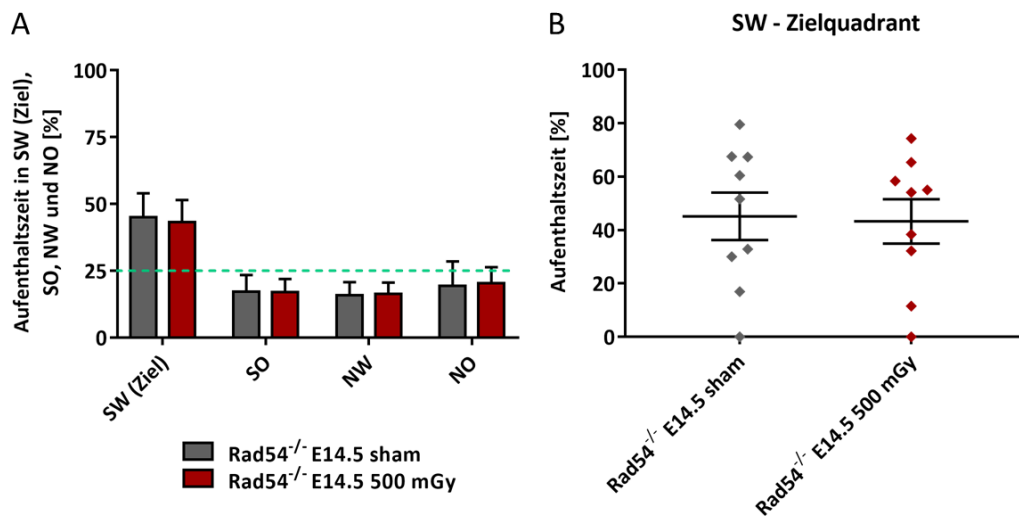


Abbildung 12: Behandlungsunabhängiges Verhalten der an E14.5 sham/ 500 mGy bestrahlten Rad54^{-/-} Tiere im Probeversuch der initialen Phase.

(A) Aufenthaltszeiten der Tiere im Zielquadranten (SW), sowie in den Quadranten SO, NW und NO während des Probeversuchs. Dieser erfolgte am sechsten Tag ohne Plattform. Die grün markierte 25 % Linie weist auf die Aufenthaltszeit hin, welche bei zufälligem Verhalten zu erwarten wäre. (B) Streudiagramm der Aufenthaltszeiten der Tiere im Zielquadranten (SW). Dargestellte Abweichungen vom Mittelwert entsprechen dem SEM. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen mit dem Sidak-Mehrfachvergleichstest (A) und ungepaarten t-Test (B) festgestellt werden. Rad54^{-/-} E14.5 sham n= 9, Rad54^{-/-} E14.5 500 mGy n= 9.

Der Probeversuch der initialen Phase deckte ebenfalls keine Unterschiede zwischen den sham und 500 mGy bestrahlten Rad54^{-/-} Mäusen auf. Die Tiere favorisierten gruppenübergreifend den Zielquadranten (Abb. 12 A) und hielten sich prozentual gleichermaßen lange in diesem auf (sham= 45,2±8,9 %, 500 mGy= 43,3±8,3 %) (Abb. 12 B).

Die initiale Phase des *MWM* zeigte keine Unterschiede im Lernverhalten zwischen den an E14.5 500 mGy und sham bestrahlten Rad54^{-/-} Tieren.

4.3.2.2 Umkehrphase des *MWM*-Tests

An die initiale Phase schloss sich eine fünftägige Umkehrphase, in welcher die Plattform vom Süd-West Quadranten in den Nord-Ost Quadranten verschoben wurde. Aufgabe der Tiere war es nun die neue Plattformposition zu erlernen.

Wie erwartet erreichten die Tiere gruppenübergreifend am zweiten Tag der Umkehrphase die Plattform schneller, als am zweiten Tag der initialen Phase (initiale Phase Tag 2: sham= 70,1±10,4 s, 500 mGy= 97,6±7,2 s, Umkehrphase Tag 2: sham= 48,5±14,5 s, 500 mGy= 42,0±12,3 s) (vgl. Abb. 11 B mit 13 B). Dies zeigte, dass die Mäuse das Prinzip des *MWM*-Tests erlernt hatten und nun ihre

Suchstrategie auf die neue Plattformposition anpassen mussten. In der Umkehrphase konnten weder, in den Zeiten die die Tiere benötigten um die Plattform zu erreichen (Abb. 13 A - E), noch im Einsatz von räumlichen Suchstrategien (Abb. 13 F) signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen festgestellt werden.

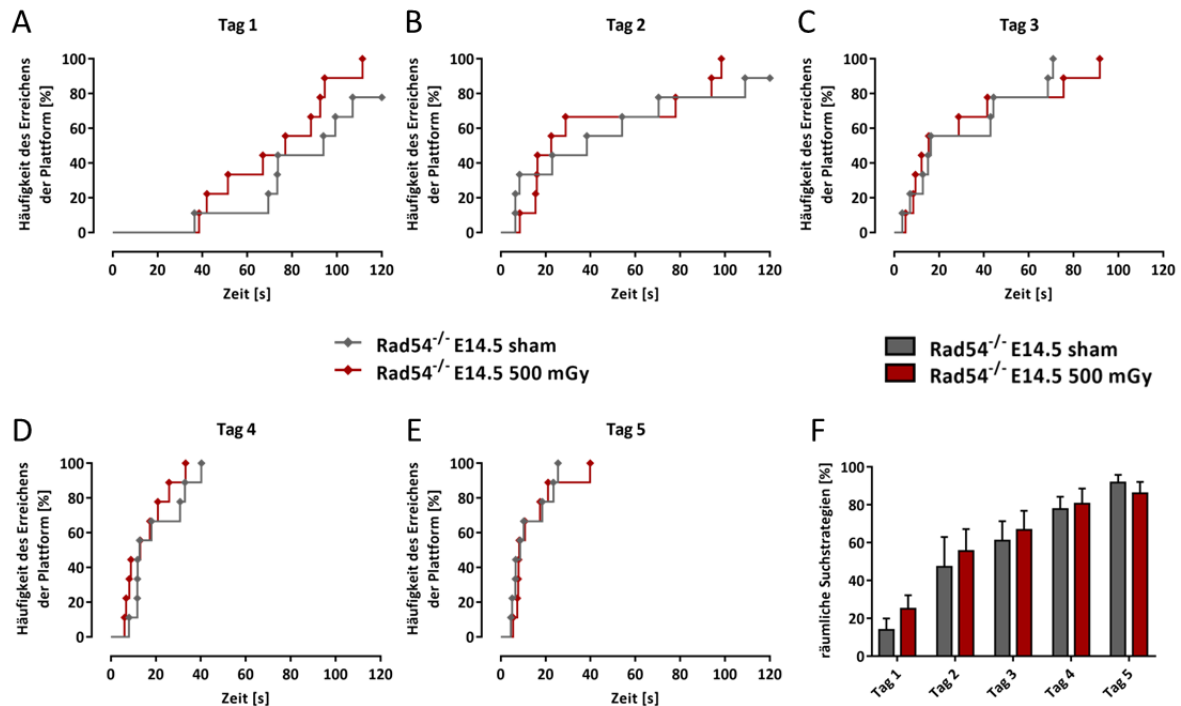


Abbildung 13: Keine Unterschiede im Lernverhalten der an E14.5 sham/ 500 mGy bestrahlten *Rad54*^{-/-} Tiere während der Umkehrphase des MWM-Tests.

(A - E) Aufgetragen ist die Häufigkeit des Erreichens der Plattform und die durchschnittliche Zeit, die dafür benötigt wurde. Jedes Tier hatte pro Tag vier Versuche die Plattform aus unterschiedlichen Startpositionen zu finden, wobei jeder Versuch maximal 120 Sekunden dauerte. Es konnten keine Signifikanzen festgestellt werden, unter Berücksichtigung der Bonferroni Korrektur mit dem Mantel-Cox und dem Gehan-Breslow-Wilcoxon Test. (F) Dargestellt sind die durchschnittlich eingesetzten räumlichen Suchstrategien während der Umkehrphase. Die dargestellten Abweichungen vom Mittelwert entsprechen dem SEM. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen mit dem Sidak-Mehrfachvergleichstest ermittelt werden. *Rad54*^{-/-} E14.5 sham n= 9, *Rad54*^{-/-} E14.5 500 mGy n= 9.

Auch der Probeversuch der Umkehrphase zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen (Abb. 14). Die Tiere favorisierten deutlich den Zielquadranten (sham= 57,9 %, 500 mGy= 56 %) (Abb. 14 A). Dabei gingen die zuvor in der initialen Phase großen Streuungen (initiale Phase: sham SEM= 8,9 %, 500 mGy SEM= 8,3 %) teilweise erheblich zurück (Umkehrphase: sham SEM= 4,3 %, 500 mGy SEM= 6,7 %) (vgl. Abb. 12 B mit 14 B).

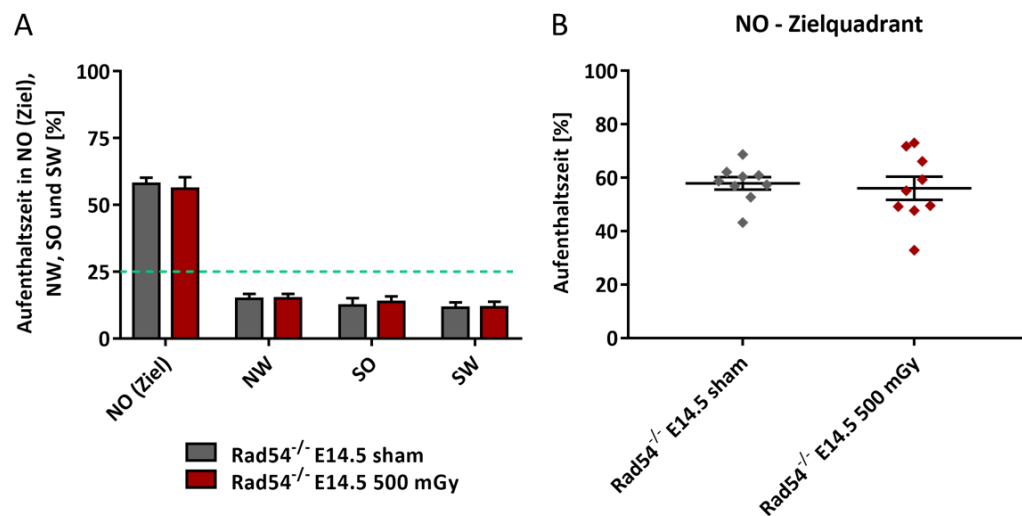


Abbildung 14: Behandlungsunabhängiges Verhalten der an E14.5 sham/ 500 mGy bestrahlten Rad54^{-/-} Tiere im Probeversuch der Umkehrphase.

(A) Aufenthaltszeiten der Tiere im Zielquadranten (NO), sowie in den Quadranten NW, SO und SW während des Probeversuches. Dieser erfolgte am sechsten Tag ohne Plattform. Die grün markierte 25 % Linie weist auf die Aufenthaltszeit hin, welche bei zufälligem Verhalten zu erwarten wäre. (B) Streudiagramm der Aufenthaltszeiten der Tiere im Zielquadranten (NO). Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen mit dem Sidak-Mehrfachvergleichstest (A) und ungepaarten t-Test (B) festgestellt werden. Abweichungen vom Mittelwert entsprechen dem SEM. Rad54^{-/-} E14.5 sham n= 9, Rad54^{-/-} E14.5 500 mGy n= 9.

4.3.3 Vergleich des räumlichen Lernverhaltens der an p10 sham und 500 mGy bestrahlten Rad54^{-/-} Tiere

Neben dem Embryonalstadium E14.5 sollte ebenso die Radiosensitivität des frühen postnatalen Stadiums p10 überprüft werden. In diesem Zeitraum befindet sich das murine Gehirn in einem Wachstumsschub¹⁰², bei welchem die Dichte der Axone und Dendriten drastisch zunimmt¹⁰³ und zugleich die Gliogenese¹⁰⁴ ihren Höhepunkt erreicht. Das frühe postnatale Stadium beschreibt daher eine besonders sensible Phase der murinen Gehirnentwicklung.

4.3.3.1 Initiale Phase des MWM-Tests

Die initiale Phase des MWM-Tests der an p10 500 mGy und sham bestrahlten Rad54^{-/-} Tiere zeigte ähnliche Tendenzen wie schon zuvor die initiale Phase der an E14.5 500 mGy bzw. sham bestrahlten Rad54^{-/-} Tiere. So benötigten sowohl die an p10 500 mGy als auch die sham bestrahlten Tiere verhältnismäßig viel Zeit am ersten Tag der Trainingsphase um die versteckte Plattform zu erreichen (Abb. 15 A). Die Zeit zum Erreichen der Plattform verringerte sich erwartungsgemäß über die fünftägige initiale Phase. Interessanterweise unterschieden sich die Lernkurven der 500 mGy und

¹⁰² Bockhorst et al. 2008; Dobbing und Sands 1979.

¹⁰³ Cowan 1979; Baloch et al. 2009.

¹⁰⁴ Catalani et al. 2002; Kriegstein und Alvarez-Buylla 2009.

sham bestrahlten Tiere kaum (Abb. 15 A - E). Der Einsatz an räumlichen Suchstrategien um die Plattform ausfindig zu machen erhöhte sich erst ab dem vierten Tag der initialen Phase in der Gruppe der sham bestrahlten Mäuse deutlich (Tag 3: $22,5 \pm 7,8$ %, Tag 4: $47,5 \pm 10,8$ %) (Abb. 15 F). Der geringe Einsatz an räumlichen Suchstrategien der 500 mGy bestrahlten Gruppe am vierten Tag ($17,5 \pm 7,5$ %) spiegelte sich ebenso negativ in der Zeit des Erreichens der Plattform wider. So benötigten die 500 mGy bestrahlten Tiere im Schnitt $90,9 \pm 9$ Sekunden um die Plattform ausfindig zu machen, die sham bestrahlten Tiere hingegen nur $61,8 \pm 11$ Sekunden. Signifikante Unterschiede im Einsatz von räumlichen Suchstrategien oder im Erreichen der Plattform konnten jedoch zwischen den Behandlungsgruppen während der gesamten initialen Phase nicht festgestellt werden.

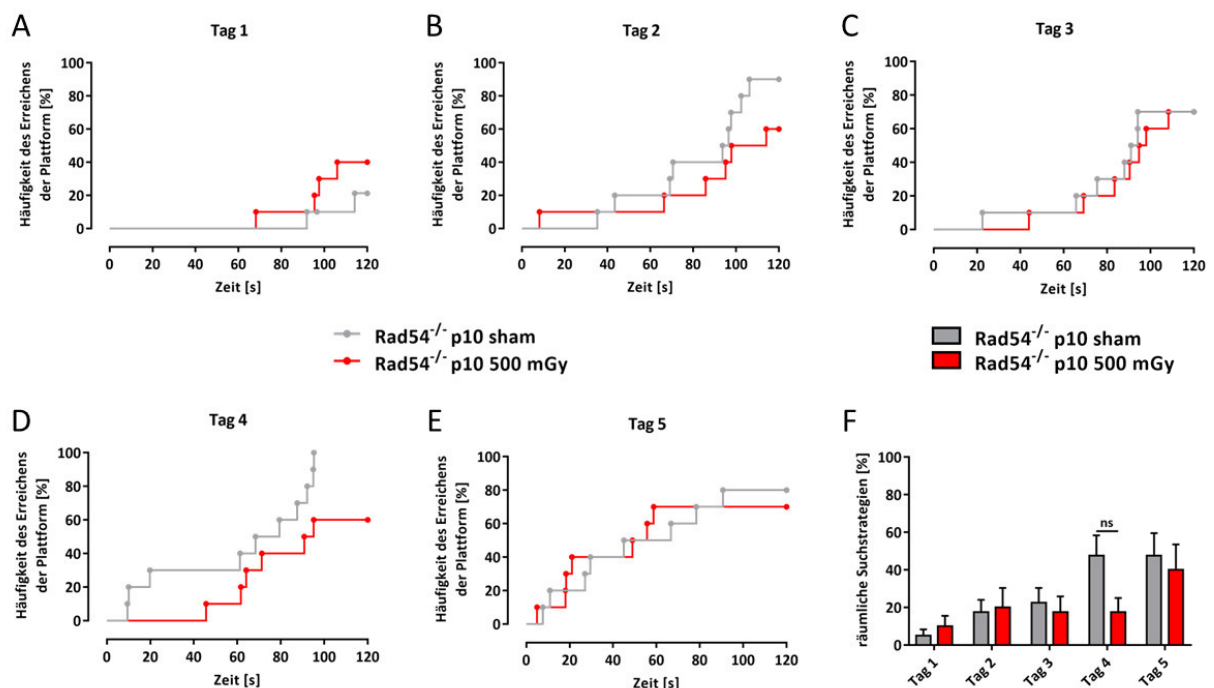


Abbildung 15: Kaum Unterschiede im Lernverhalten der an p10 sham/ 500 mGy bestrahlten Rad54^{-/-} Tiere während der initialen Phase des MWM-Tests.

(A - E) Aufgetragen ist die Häufigkeit des Erreichens der Plattform und die durchschnittliche Zeit, die dafür benötigt wurde. Jedes Tier hatte pro Tag vier Versuche die Plattform aus unterschiedlichen Startpositionen zu finden, wobei jeder Versuch maximal 120 Sekunden dauerte. Es konnten keine Signifikanzen unter Berücksichtigung der Bonferroni Korrektur mit dem Mantel-Cox und dem Gehan-Breslow-Wilcoxon Test festgestellt werden. (F) Dargestellt sind die durchschnittlich eingesetzten räumlichen Suchstrategien während der initialen Phase. Dargestellte Abweichungen vom Mittelwert entsprechen dem SEM. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen mit dem Sidak-Mehrfachvergleichstest ermittelt werden; $p > 0,1234$ (ns). Rad54^{-/-} p10 sham $n = 10$, Rad54^{-/-} p10 500 mGy $n = 10$.

Am sechsten Tag der initialen Phase wurde ein Probeversuch ohne Plattform durchgeführt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen festgestellt werden (Abb. 16).

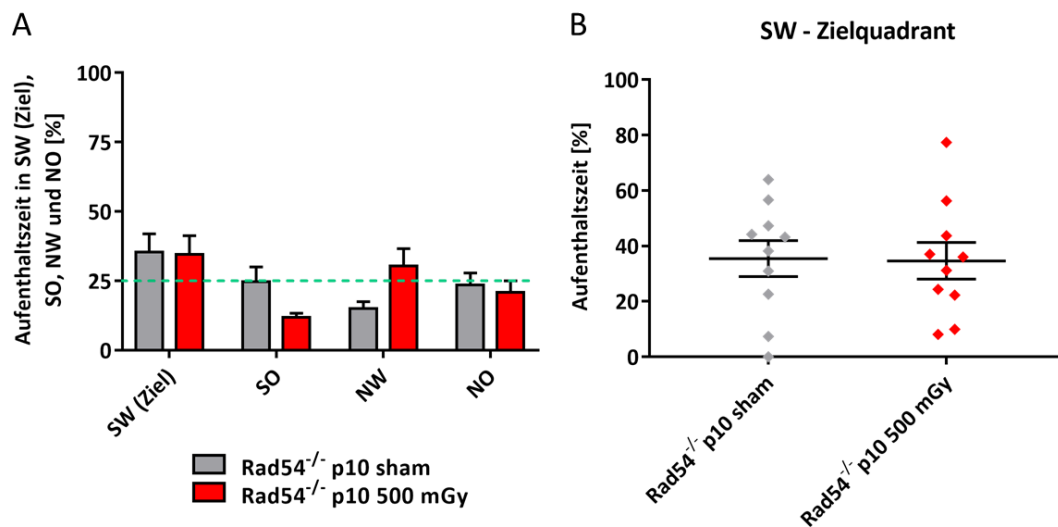


Abbildung 16: Behandlungsunabhängiges Verhalten der an p10 sham/ 500 mGy bestrahlten Rad54^{-/-} Tiere im Probeversuch der initialen Phase.

(A) Aufenthaltszeiten der Tiere im Zielquadranten (SW), sowie in den Quadranten SO, NW und NO während des Probeversuches. Dieser erfolgte am sechsten Tag ohne Plattform. Die grün markierte 25 % Linie weist auf die Aufenthaltszeit hin, welche bei zufälligem Verhalten zu erwarten wäre. (B) Streudiagramm der Aufenthaltszeiten der Tiere im Zielquadranten (SW). Dargestellte Abweichungen vom Mittelwert entsprechen dem SEM. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen mit dem Sidak-Mehrfachvergleichstest (A) und ungepaarten t-Test (B) festgestellt werden. Abweichungen vom Mittelwert entsprechen dem SEM. Rad54^{-/-} p10 sham n= 10, Rad54^{-/-} p10 500 mGy n= 10.

Die Tiere favorisierten den Zielquadranten (sham= 35,4 %, 500 mGy= 34,7 %) und zeigten in den Gruppen ähnliche Streuungen um den mittleren Wert der Aufenthaltszeit im Zielquadranten (sham SEM= 6,5 %, 500 mGy SEM= 6,6 %).

4.3.3.2 Umkehrphase des *MWM*-Tests

Nach der initialen Phase, schloss sich die Umkehrphase des *MWM*-Tests an. Die Lernkurven der 500 mGy und sham bestrahlten Tiere verliefen über den gesamten fünftägigen Trainingsverlauf fast identisch (Abb. 17 A-E). Dabei setzten die Rad54^{-/-} Mäuse behandlungsunabhängig ab dem zweiten Tag der Umkehrphase deutlich mehr räumliche Suchstrategien ein als am zweiten Tag der initialen Phase (sham: initiale Phase = 17,5±6,5 %, Umkehrphase=37,5±14,6 %, 500 mGy: initiale Phase=20±10,4%, Umkehrphase= 42,5±11,8 %). Der erhöhte Einsatz an räumlichen Suchstrategien spiegelte sich auch in der Zeit des Erreichens der Plattform wider. So benötigten beispielsweise die sham bestrahlten Rad54^{-/-} Tiere am dritten Tag der initialen Phase noch im Schnitt 89,1±9,5 Sekunden um die Plattform zu erreichen, während es zum gleichen Tag während der Umkehrphase nur noch 51,8±8,7 Sekunden waren. Diese Ergebnisse verdeutlichen den engen Zusammenhang zwischen dem Einsatz von räumlichen Suchstrategien und dem erfolgreichen Auffinden der Plattform. Die Rad54^{-/-} Mäuse zeigten behandlungsunabhängig eine Verbesserung des Lernverhaltens von initialer- zur Umkehrphase des *MWM*-Tests.

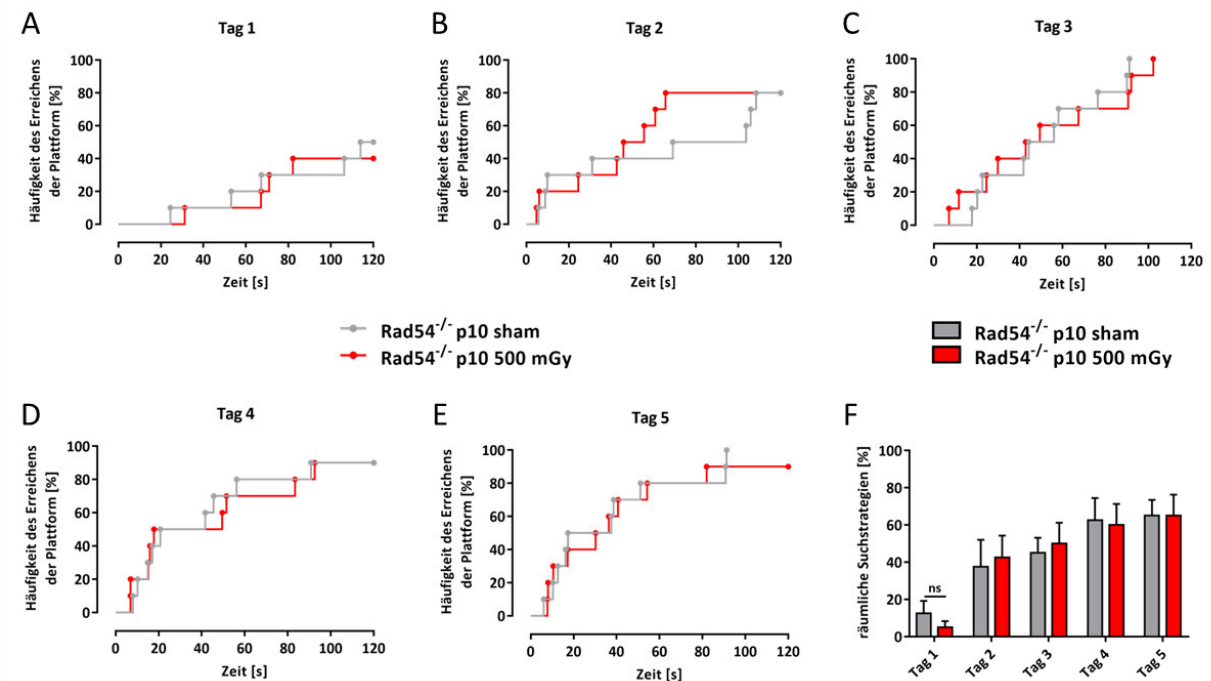


Abbildung 17: Keine signifikanten Unterschiede im Lernverhalten der an p10 sham/ 500 mGy bestrahlten Rad54^{-/-} Tiere während der Umkehrphase des MWM-Tests.

(A - E) Aufgetragen ist die Häufigkeit des Erreichens der Plattform und die durchschnittliche Zeit, die dafür benötigt wurde. Jedes Tier hatte pro Tag vier Versuche die Plattform, aus unterschiedlichen Startpositionen zu finden, wobei jeder Versuch maximal 120 Sekunden dauerte. Es konnten keine Signifikanzen festgestellt werden, unter Berücksichtigung der Bonferroni Korrektur mit dem Mantel-Cox und dem Gehan-Breslow-Wilcoxon Test. (F) Dargestellt sind die durchschnittlich eingesetzten räumlichen Suchstrategien während der Umkehrphase. Dargestellte Abweichungen vom Mittelwert entsprechen dem SEM. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen mit dem Sidak-Mehrfachvergleichstest festgestellt werden, $p > 0,1234$ (ns). Rad54^{-/-} p10 sham $n = 10$, Rad54^{-/-} p10 500 mGy $n = 10$.

Auch der Probeversuch am sechsten Tag der Umkehrphase wies keine Unterschiede im Verhalten zwischen den Behandlungsgruppen auf. Die Tiere hielten sich überwiegend im Zielquadranten auf (sham = $49,4 \pm 6,7$ %, 500 mGy = $46,6 \pm 4,6$ %) und zeigten eine ähnliche Streuung um den Mittelwert der Aufenthaltszeit im nordöstlichen Zielquadranten (sham SEM = 6,7 %, 500 mGy SEM = 4,5 %) (Abb. 18).

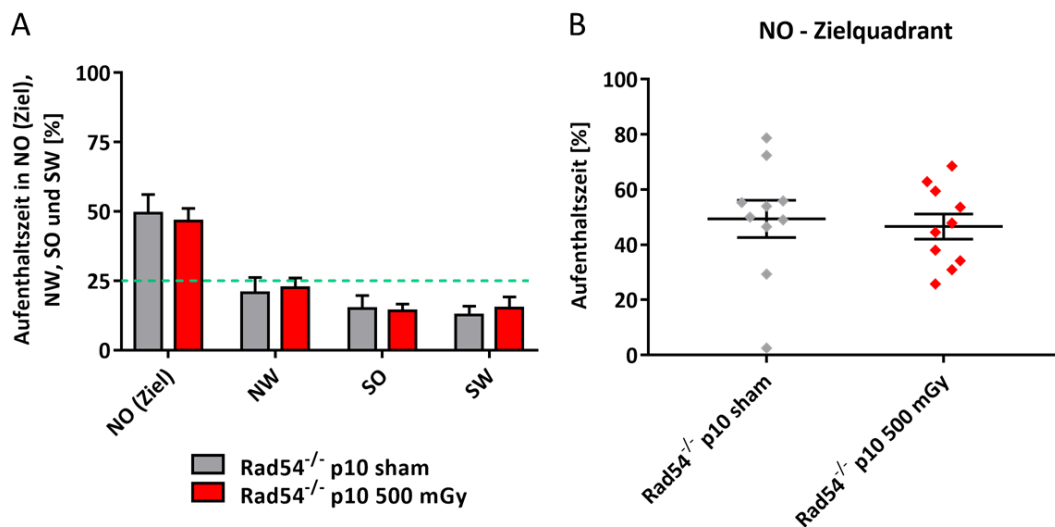


Abbildung 18: Behandlungsunabhängiges Verhalten der an p10 sham/ 500 mGy bestrahlten Rad54^{-/-} Tiere im Probeversuch der Umkehrphase.

(A) Aufenthaltszeiten der Tiere im Zielquadranten (NO), sowie in den Quadranten NW, SO und SW während des Probeversuches. Dieser erfolgte am sechsten Tag ohne Plattform. Die grün markierte 25 % Linie weist auf die Aufenthaltszeit hin, welche bei zufälligem Verhalten zu erwarten wäre. (B) Streudiagramm der Aufenthaltszeiten der Tiere im Zielquadranten (NO). Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen mit dem Sidak-Mehrfachvergleichstest (A) und ungepaarten t-Test (B) festgestellt werden. Abweichungen vom Mittelwert entsprechen dem SEM. Rad54^{-/-} p10 sham n= 10, Rad54^{-/-} p10 500 mGy n=10.

Insgesamt konnte eine gruppenübergreifende Verbesserung der Zeiten im Erreichen der Plattform und dem Einsatz von räumlichen Suchstrategien von initialer zur Umkehrphase ausgemacht werden. So benötigte die sham bestrahlte Rad54^{-/-} Gruppe (E14.5 sham/ p10 sham) in der initialen Phase im gesamten Mittel noch 74,5±5,1 s um die Plattform zu erreichen, in der Umkehrphase waren es nur noch 49,6±6,8 s. Die an E14.5 500 mGy bestrahlten Tiere benötigten über die gesamte initiale Trainingsphase im Mittel 76,7±11,6 s und die an p10 500 mGy bestrahlten Tiere sogar 89,6±7,4 s um die Plattform zu finden, aber auch sie verbesserten sich in der Umkehrphase erheblich, sodass die E14.5 500 mGy bestrahlten Tiere im Schnitt, nur noch 35,5±9,7 s und die an p10 500 mGy bestrahlten Tiere im Mittel, nur noch 58,1± 9 s benötigten um die Plattform zu erreichen.

Signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen der Rad54^{-/-} Tiere konnten hingegen im gesamten *MWM*-Test nicht ausgemacht werden. Allerdings zeigten sich an mehreren Stellen Tendenzen zu einem verzögerten Lernverhalten bei den 500 mGy bestrahlten Tieren. So setzten die an E14.5 500 mGy bestrahlten Tiere in den ersten zwei Tagen der initialen Phase kaum räumliche Suchstrategien ein (< 3 %). Die an p10 500 mGy bestrahlten Tiere hingegen wiesen schon ab dem ersten Tag der initialen Phase ein starkes Lerndefizit auf. So bildeten sie in der gesamten initialen Phase die Gruppe, die die meiste Zeit benötigte um die Plattform zu erreichen. Insgesamt 20 % länger als die sham bestrahlte Gruppe (E14.5 sham/ p10 sham) und 16 % länger als die an E14.5

500 mGy bestrahlte Gruppe. Auch der Einsatz von räumlichen Suchstrategien während der initialen Phase war am niedrigsten in der p10 500 mGy bestrahlten Gruppe. So setzten sie insgesamt 9,4 % weniger räumliche Suchstrategien ein, als die sham bestrahlten Tiere (E14.5 sham/ p10 sham) und 7,9 % weniger als die E14.5 500 mGy bestrahlten Tiere (E14.5 + p10 sham \emptyset = 30,4 \pm 9,1 %, E14.5 500 mGy= 28,9 \pm 7,7 %, p10 500 mGy= 21 \pm 9,1 %). Dieses Defizit konnte auch in der Umkehrphase nicht ausgeglichen werden. So benötigten sie im Mittel 16,9 % mehr Zeit die Plattform in der Umkehrphase zu erreichen als die sham bestrahlte Gruppe (E14.5 sham/ p10 sham). Auch der Einsatz von räumlichen Suchstrategien während der Umkehrphase war um 6,9 % reduziert, im Vergleich zu den sham bestrahlten Tieren (E14.5 sham/ p10 sham) (E14.5/ p10 sham \emptyset = 51,4 \pm 9,3 %, p10 500 mGy= 44,5 \pm 9,8 %).

Trotz des tendenziell verlangsamten Lernverhaltens der 500 mGy bestrahlten Rad54^{-/-} Mäuse, blieb ein signifikanter Unterschied zwischen sham und 500 mGy bestrahlten Tiere aus. Diese Ergebnisse unterstützen nicht die ursprüngliche Hypothese. Aus vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass in Wildtyptieren eine Niedrigdosisbestrahlung von 500 mGy zu den Entwicklungszeitpunkten E14.5 und p10 ausreichte um eine signifikante Lernbeeinträchtigung im Erwachsenenalter hervorzurufen (Axel Klink¹⁰⁵). Aufgrund dessen lag die Vermutung nahe, dass die DNS-reparaturdefizienten Rad54^{-/-} Mäuse nach Bestrahlung ein mindestens ebenso starkes Lerndefizit aufweisen müssten wie die bestrahlten Wildtyptiere. Um zu überprüfen ob die Deletion des Rad54-Gens, ohne Strahlenbelastung, zu kognitiven Entwicklungsstörungen in den Mäusen führte, sollte das Rad54^{-/-} Mausmodell im Folgenden mit Wildtyptieren verglichen werden.

4.3.4 Vergleich Wildtyp- und Rad54^{-/-} Tiere

Die phänomenologische Entwicklung der Rad54^{-/-} Mäuse wird, ohne den Einfluss äußerer Stressfaktoren, als normal beschrieben. Tiefergehende Verhaltensexperimente wurden mit diesem Modellsystem, nach unserem Wissen, noch nicht durchgeführt. Daher sollte in dieser Arbeit zuerst die motorischen Fähigkeiten und das Explorationsverhalten der Tiere untersucht werden. Beide Parameter dienten zugleich als Voraussetzung für den *MWM*-Test. Alle verarbeiteten Daten der Wildtyptiere wurden von Herrn Axel Klink bzw. unter dessen Aufsicht erhoben¹⁰⁶.

4.3.4.1 Motorik und Explorationsverhalten

Zur Überprüfung der motorischen Fähigkeiten wurden die an E14.5 und p10 sham bestrahlten Rad54^{-/-} und Wildtypiere dem *RotaRod*-Test unterzogen. Die Aufenthaltszeiten auf dem sich

¹⁰⁵ BNA 2017 Festival of Neuroscience: Abstract Book 2017; Laura Trundle | Fusion Conferences.

¹⁰⁶ Laura Trundle | Fusion Conferences; BNA 2017 Festival of Neuroscience: Abstract Book 2017.

rotierenden Stab unterschieden sich zwischen den untersuchten Gruppen kaum. So hielten sich die an E14.5 sham bestrahlten Rad54^{-/-} Tiere im Schnitt 261,2±6,8 s lang, die zum gleichen Zeitpunkt sham bestrahlten Wildtypiere 277,6±6,4 s, die an p10 sham bestrahlten Rad54^{-/-} Mäuse 267,7±6,8 und die an p10 sham bestrahlten Wildtypmäuse 280,2±5,2 s auf dem sich rotierenden Stab auf (Abb. 19 A).

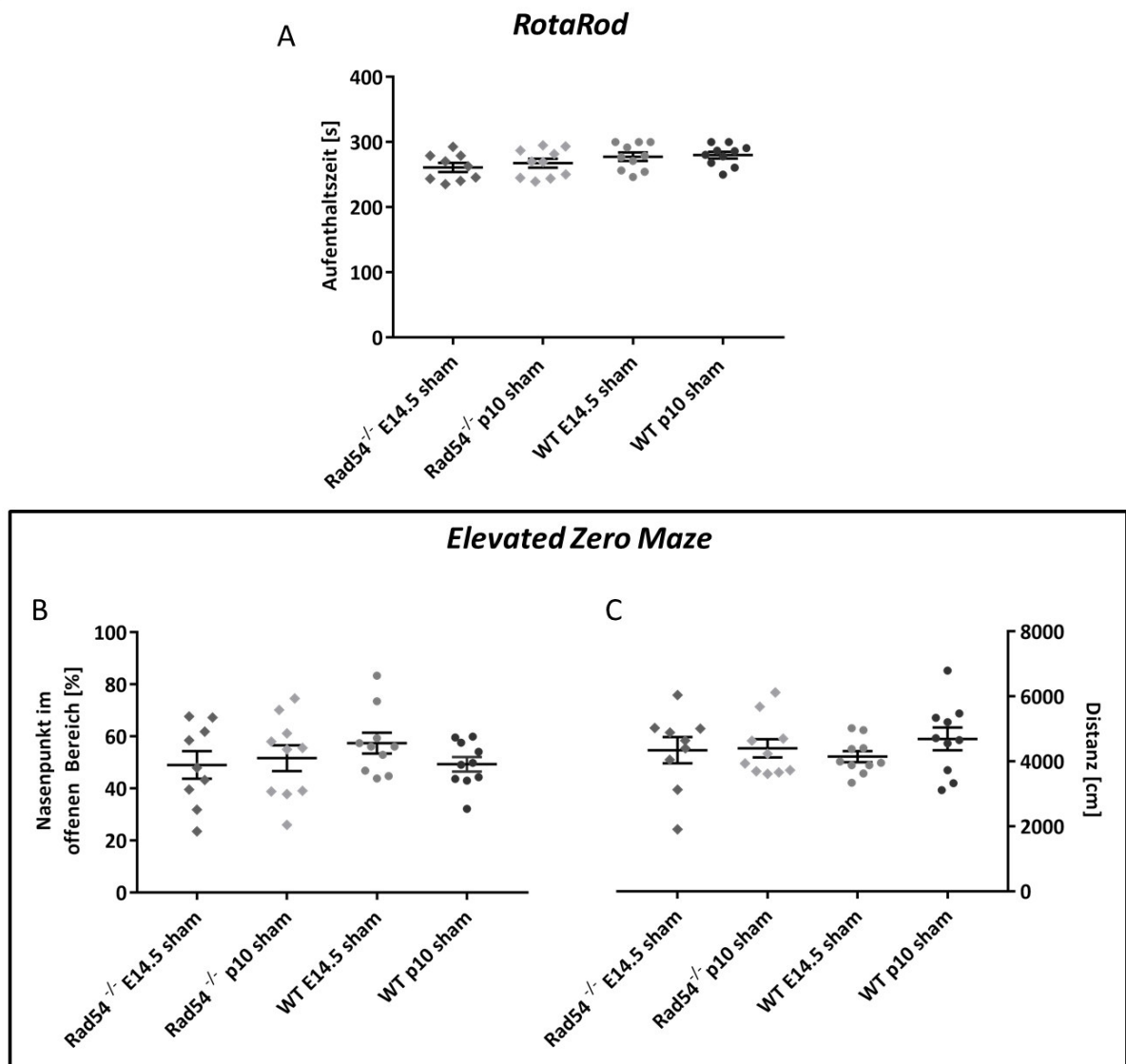


Abbildung 19: Keine signifikanten Unterschiede in der Motorik und dem Explorationsverhalten zwischen WT- und Rad54^{-/-} Mäusen.

(A) *RotaRod*-Test. Gemessen wurde die durchschnittliche Aufenthaltszeit der Mäuse auf einem sich rotierenden Stab, dessen Geschwindigkeit sich linear erhöhte. Dargestellt ist der Mittelwert aus je drei Versuchen pro Maus mit SEM. (B - C) *Elevated Zero Maze*-Test. Aufgetragen ist die Aufenthaltszeit des Nasenpunktes (B) in den offenen Bereichen, sowie die insgesamt zurückgelegte Distanz (C) während der Testlaufphase von 30 min. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen mit dem Tukey-Mehrfachvergleichstest festgestellt werden. Rad54^{-/-} E14.5 sham n= 9, Rad54^{-/-} p10 sham n= 10, Wildtyp E14.5 sham n= 10, Wildtyp p10 sham n=10.

Auch das getestete Explorationsverhalten der Tiere ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp- und Rad54^{-/-} Mäusen. So hielten sich die, sowohl an E14.5 als auch an p10 sham bestrahlten Rad54^{-/-} Tiere gleichermaßen mit ihrem Nasenpunkt in offenen und geschlossenen Bereichen des EZM auf wie die sham bestrahlten Wildtyptiere und legten ebenso ähnliche Distanzen während der 30-minütigen Testlaufphase zurück (Abb. 19 B, C).

4.3.4.2 Vergleich der an E14.5 sham bestrahlten Wildtyp- und Rad54^{-/-} Tiere im MWM-Test

Die Verhaltenstests aus Kapitel 4.3.4.1 zeigten, dass weder die motorische Entwicklung noch das Explorationsverhalten der Rad54^{-/-} Tiere beeinträchtigt war. Damit waren gleichzeitig die Voraussetzungen erfüllt um die Rad54^{-/-} Tiere mit den Wildtyptieren im MWM-Test zu vergleichen.

Die erste Phase des MWM-Tests, die initiale Phase deckte interessanterweise eine hoch signifikante Beeinträchtigung im Lernverhalten der Rad54^{-/-} Mäuse auf.

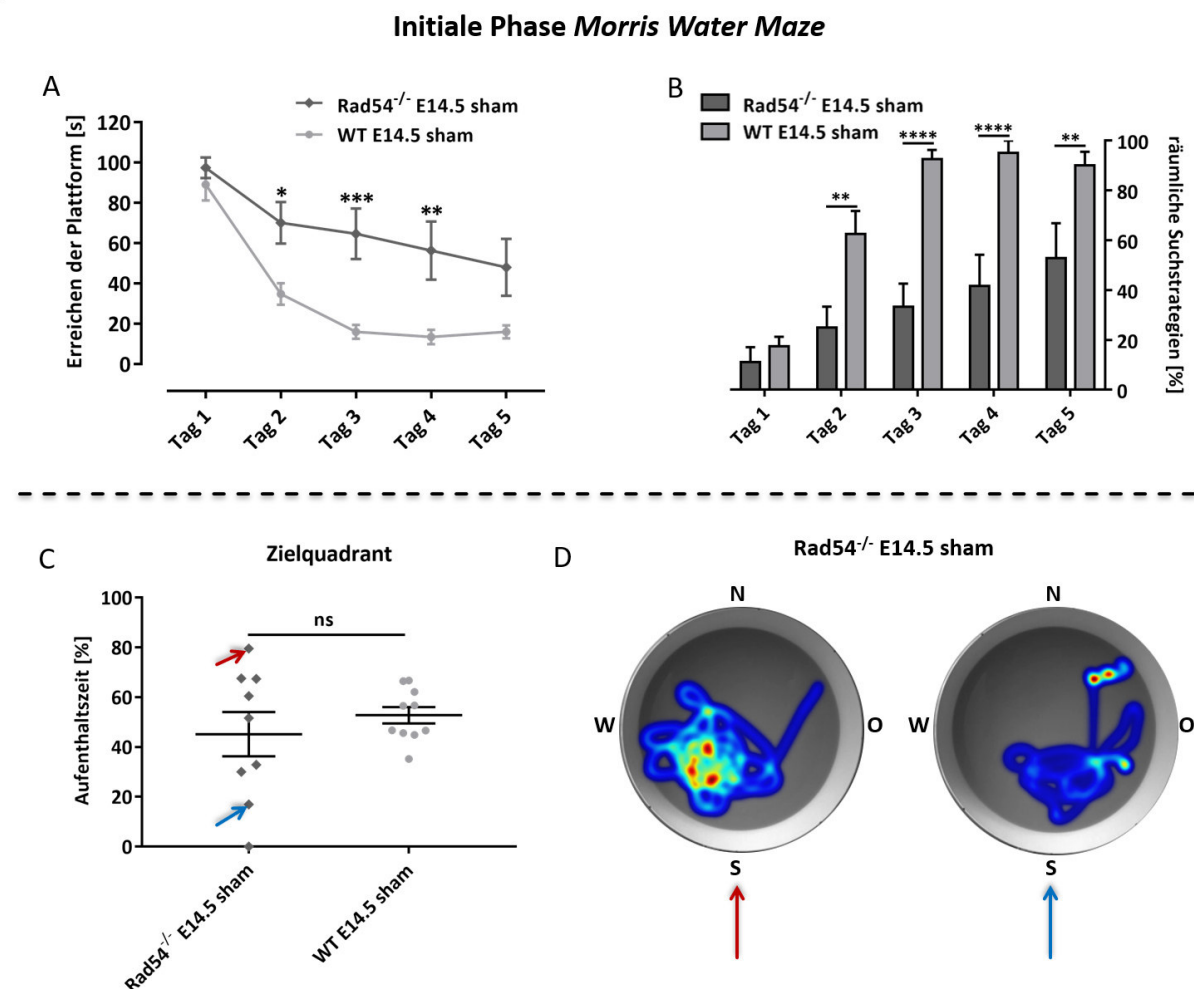


Abbildung 20: Verzögertes Lernverhalten der an E14.5 sham bestrahlten Rad54^{-/-} Tiere während der initialen Phase des MWM-Tests.

(A) Lernkurven der Rad54^{-/-} und Wildtypiere; aufgetragen sind die mittleren Zeiten der Mäuse um die Plattform zu erreichen. (B) Durchschnittlicher Einsatz räumlicher Suchstrategien während der initialen Phase des *MWM*-Tests. (C, D) Probetest der initialen Phase. (C) Streudiagramm der Aufenthaltszeiten der Tiere im Zielquadranten (SW). Pfeile weisen Tiere aus, die überdurchschnittlich viel (rot) bzw. unterdurchschnittlich wenig (blau) Zeit im Zielquadranten verbracht haben, mit den dazugehörigen Schwimmpfaden (D), rot markierte Stellen verweisen auf eine lange Aufenthaltszeit, blaue Stellen auf eine kurze. (A - C) Abweichungen vom Mittelwert entsprechen dem SEM. Signifikanzen wurden mit dem Sidak-Mehrfachvergleichstest (A, B) und dem ungepaarten t-Test (C) ermittelt; $p > 0,1234$ (ns), $p < 0,0332$ (*), $p < 0,0021$ (**), $p < 0,0002$ (***), $p \leq 0,0001$ (****). Rad54^{-/-} E14.5 sham $n = 9$, WT E14.5 sham $n = 10$.

So benötigten die Rad54^{-/-} Tiere am zweiten Tag der initialen Phase doppelt so viel Zeit, in den Tagen drei und vier sogar viermal so viel Zeit wie die Wildtypiere um die Plattform zu erreichen (Tag 2: Rad54^{-/-} = 70,1±10,4 s, WT = 34,8±7,9 s, Tag 3: Rad54^{-/-} = 64,7±12,6 s, WT = 16,1±3,4 s, Tag 4: Rad54^{-/-} = 56,4±14,4 s, WT = 13,5±3,6 s) (Abb. 20 A). Das beeinträchtigte Lernverhalten der Rad54^{-/-} Tiere spiegelte sich auch in der Wahl der Suchstrategien wider. So setzten sie ab dem zweiten Tag der initialen Phase signifikant weniger räumliche Suchstrategien ein als die Wildtypiere. Während die Wildtypiere ab dem zweiten Tag der initialen Phase im Mittel über 60 % räumliche Suchstrategien einsetzten, waren es bei den Rad54^{-/-} Tiere gerade einmal 25 %. Ab dem dritten Tag erhöhte sich der Einsatz an räumlichen Suchstrategien bei den Wildtypieren auf über 90 %, die Rad54^{-/-} Tiere hingegen, setzten bis zum letzten Tag nicht mehr als 53 % räumliche Suchstrategien ein um die Plattform zu erreichen (Abb. 20 B).

Nur im Probeversuch am sechsten Tag der initialen Phase konnten keine signifikanten Unterschiede mehr zwischen Rad54^{-/-} und Wildtypieren ausgemacht werden. Beide Gruppen hielten sich im Mittel vorzugsweise im Zielquadranten auf (Rad54^{-/-} = 45,2±8,9 %, WT = 52,8±3,3 %) (Abb. 20 C). Auffällig hierbei war allerdings die große Streuung innerhalb der Rad54^{-/-} Gruppe (SEM: Rad54^{-/-} = 8,9 %, WT = 3,3 %). So gab es Tiere die überdurchschnittlich viel Zeit im Zielquadranten verweilten (roter Pfeil = 79,5 %) und Tiere die unterdurchschnittlich wenig Zeit im Zielquadranten verblieben (blauer Pfeil = 16,9 %) (Abb. 20 D).

In der zweiten Phase des *MWM*-Tests, der Umkehrphase, wurde die Plattformposition in die Mitte des Nord-Ost Quadranten platziert. Dabei zeigten die Rad54^{-/-} Mäuse in den ersten zwei Tagen noch ein beeinträchtiges Lernverhalten. So benötigten sie signifikant mehr Zeit die Plattform zu erreichen, als die Wildtypiere (Tag 1: Rad54^{-/-} = 88,2±9,1 s, WT = 56,8±9 s, Tag 2: Rad54^{-/-} = 48,5±14,5 s, WT = 14,5±1,9 s) und setzten in den ersten drei Tagen signifikant weniger räumliche Suchstrategien ein als die Wildtypiere (Tag 1: Rad54^{-/-} = 13,9±6 %, WT = 47,5±8,7 %, Tag 2: Rad54^{-/-} = 47,2±15,8 %, WT = 95±3,3 %, Tag 3: Rad54^{-/-} = 61,1±10,3 %, WT = 92,5±3,8 %) (Abb. 21 A, B).

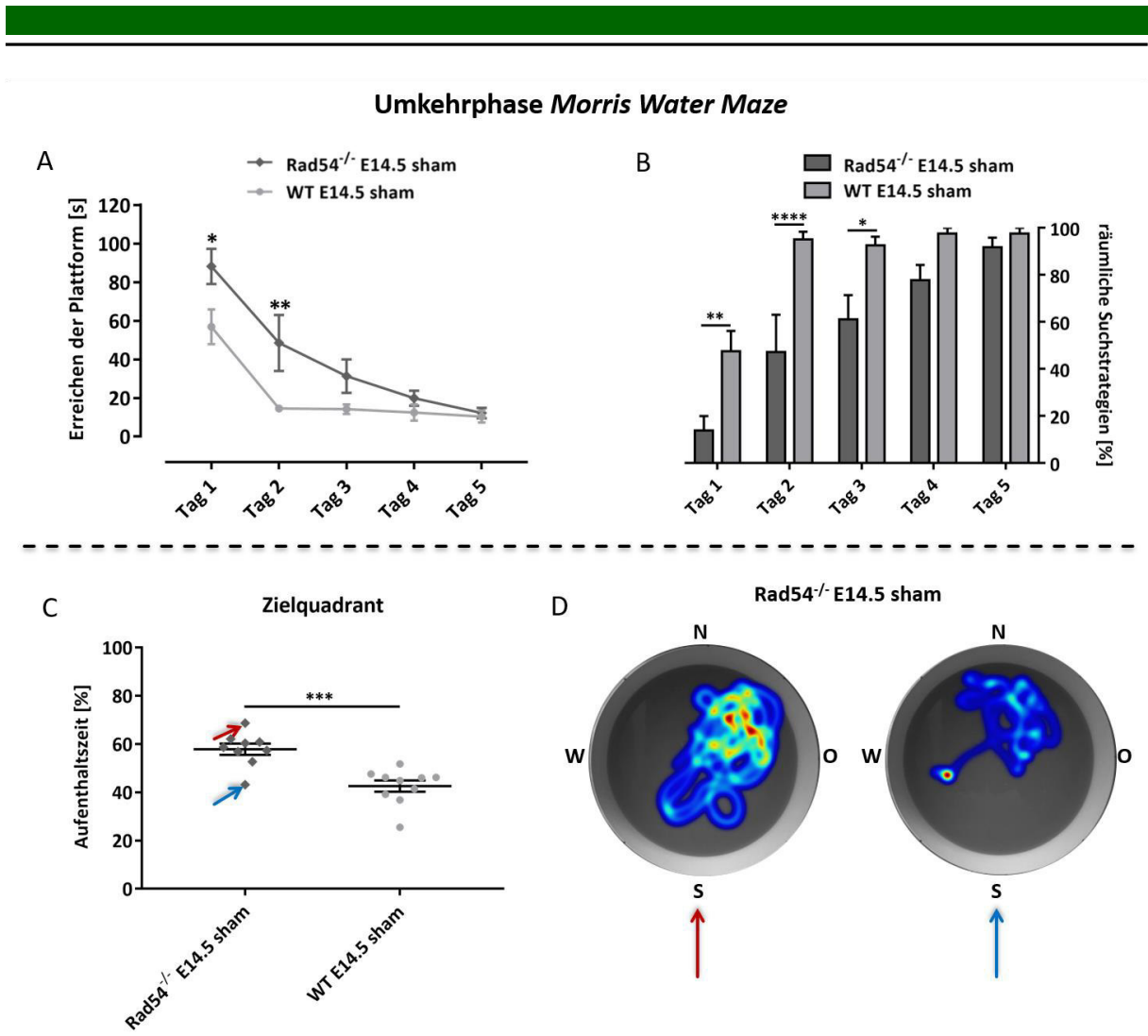


Abbildung 21: Anfänglich verzögertes Lernverhalten der an E14.5 sham bestrahlten Rad54^{-/-} Tiere während der Umkehrphase des MWM-Tests.

(A) Lernkurven der Rad54^{-/-} und Wildtypiere; aufgetragen sind die mittleren Zeiten der Mäuse um die Plattform zu erreichen. (B) Durchschnittlicher Einsatz räumlicher Suchstrategien während der Umkehrphase des MWM-Tests. (C, D) Probestest der Umkehrphase. (C) Streudiagramm der Aufenthaltszeiten der Tiere im Zielquadranten (NO). Pfeile weisen Tiere aus, die überdurchschnittlich viel (rot) bzw. unterdurchschnittlich wenig (blau) Zeit im Zielquadranten verbracht haben, mit den dazugehörigen Schwimmpfaden (D), rot markierte Stellen verweisen auf eine lange Aufenthaltszeit, blaue Stellen auf eine kurze. (A - C) Abweichungen vom Mittelwert entsprechen dem SEM. Signifikanzen wurden mit dem Sidak-Mehrfachvergleichstest (A, B) und dem ungepaarten t-Test (C) ermittelt; $p < 0,0332$ (*), $p < 0,0021$ (**), $p < 0,0002$ (***), $p < 0,0001$ (****). Rad54^{-/-} E14.5 sham $n = 9$, WT E14.5 sham $n = 10$.

Interessanterweise hielten sich die Rad54^{-/-} Tiere im Probeversuch der Umkehrphase signifikant länger im Zielquadranten auf als die Wildtypiere (Rad54^{-/-} = $57,9 \pm 2,3$ %, WT = $42,6 \pm 2,3$ %). Zudem sank die in der initialen Phase beobachtete starke Streuung innerhalb der Rad54^{-/-} Gruppe (SEM = 2,3 %, vgl. Abb. 20 C mit 21 C). Alle Tiere hielten sich nun überwiegend im Zielquadranten auf (roter Pfeil = 68,7 %, blauer Pfeil = 43,2 %) (Abb. 21 C, D). Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die Rad54^{-/-} Tiere besonders beim Erinnern an die genaue Plattformposition Defizite aufwiesen.

4.3.4.3 Vergleich der an E14.5 500 mGy bestrahlten Wildtyp- und Rad54^{-/-} Tiere im MWM-Test

Nachdem der Vergleich der an E14.5 sham bestrahlten Wildtyp- und Rad54^{-/-} Tiere erhebliche Beeinträchtigungen im Lernverhalten der Rad54^{-/-} Mäuse aufdeckte, sollten nun die an E14.5 500 mGy bestrahlten Wildtyp- und Rad54^{-/-} Tiere miteinander verglichen werden. Interessanterweise zeigten sich in der gesamten fünftägigen initialen Phase, weder in den Zeiten, die die Tiere benötigten um die Plattform zu erreichen, noch beim Einsatz von räumlichen Suchstrategien signifikanten Unterschiede zwischen den 500 mGy bestrahlten Rad54^{-/-} und Wildtyptieren (Abb. 22 A, B).

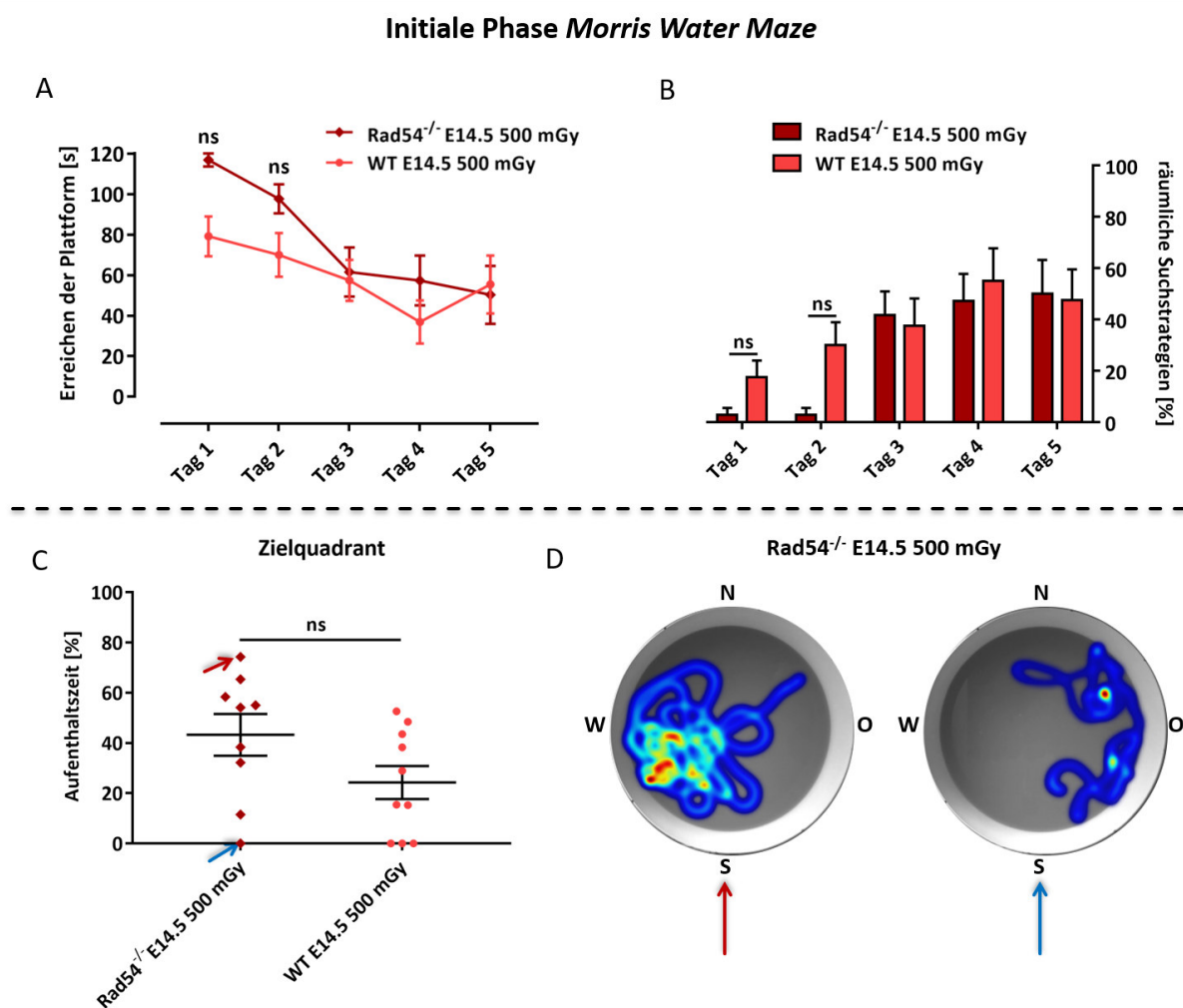


Abbildung 22: Fast identisches Lernverhalten der an E14.5 500 mGy bestrahlten Rad54^{-/-} und Wildtypiere während der initialen Phase des MWM-Tests.

(A) Lernkurven der Rad54^{-/-} und Wildtypiere; aufgetragen sind die mittleren Zeiten der Mäuse um die Plattform zu erreichen. (B) Durchschnittlicher Einsatz räumlicher Suchstrategien während der initialen Phase des MWM-Tests. (C, D) Probestest der initialen Phase. (C) Streudiagramm der Aufenthaltszeiten der Tiere im Zielquadranten (SW). Pfeile weisen Tiere aus, die überdurchschnittlich viel (rot) bzw. unterdurchschnittlich wenig (blau) Zeit im Zielquadranten verbracht haben, mit den dazugehörigen Schwimmpfaden (D), rot markierte Stellen verweisen auf eine lange Aufenthaltszeit, blaue Stellen auf eine kurze. (A - C) Abweichungen vom Mittelwert entsprechen dem SEM. Es konnten keine signifikanten

Unterschiede mit dem Sidak-Mehrfachvergleichstest (A, B) und dem ungepaarten t-Test (C) festgestellt werden; $p > 0,1234$ (ns). Rad54^{-/-} E14.5 500 mGy $n = 9$, WT E14.5 500 mGy $n = 10$.

Der Probeversuch am sechsten Tag der initialen Phase, deckte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen auf (Abb. 22 C). Auch in der 500 mGy bestrahlten Rad54^{-/-} Gruppe gab es Tiere die überdurchschnittlich viel Zeit (roter Pfeil= 74,3 %) und Tiere die unterdurchschnittlich wenig Zeit (blauer Pfeil= 0 %) im Zielquadranten verbrachten (Abb. 22 C, D).

Die anschließende Umkehrphase zeigte nur am ersten Tag ein leichtes Lerndefizit der Rad54^{-/-} Mäuse. So benötigten sie 41 % mehr Zeit um die Plattform zu erreichen, als die Wildtypiere (Rad54^{-/-} = 73,7±8,5 s, WT= 43,4±8,2 s) (Abb. 23 A). Zudem setzten die Rad54^{-/-} Tiere am ersten Tag der Umkehrphase 52 % weniger räumliche Suchstrategien ein als die Wildtypiere (Rad54^{-/-} = 25±7,2 %, WT= 52,5±6,9 %, $p = 0,079$) (Abb. 23 B).

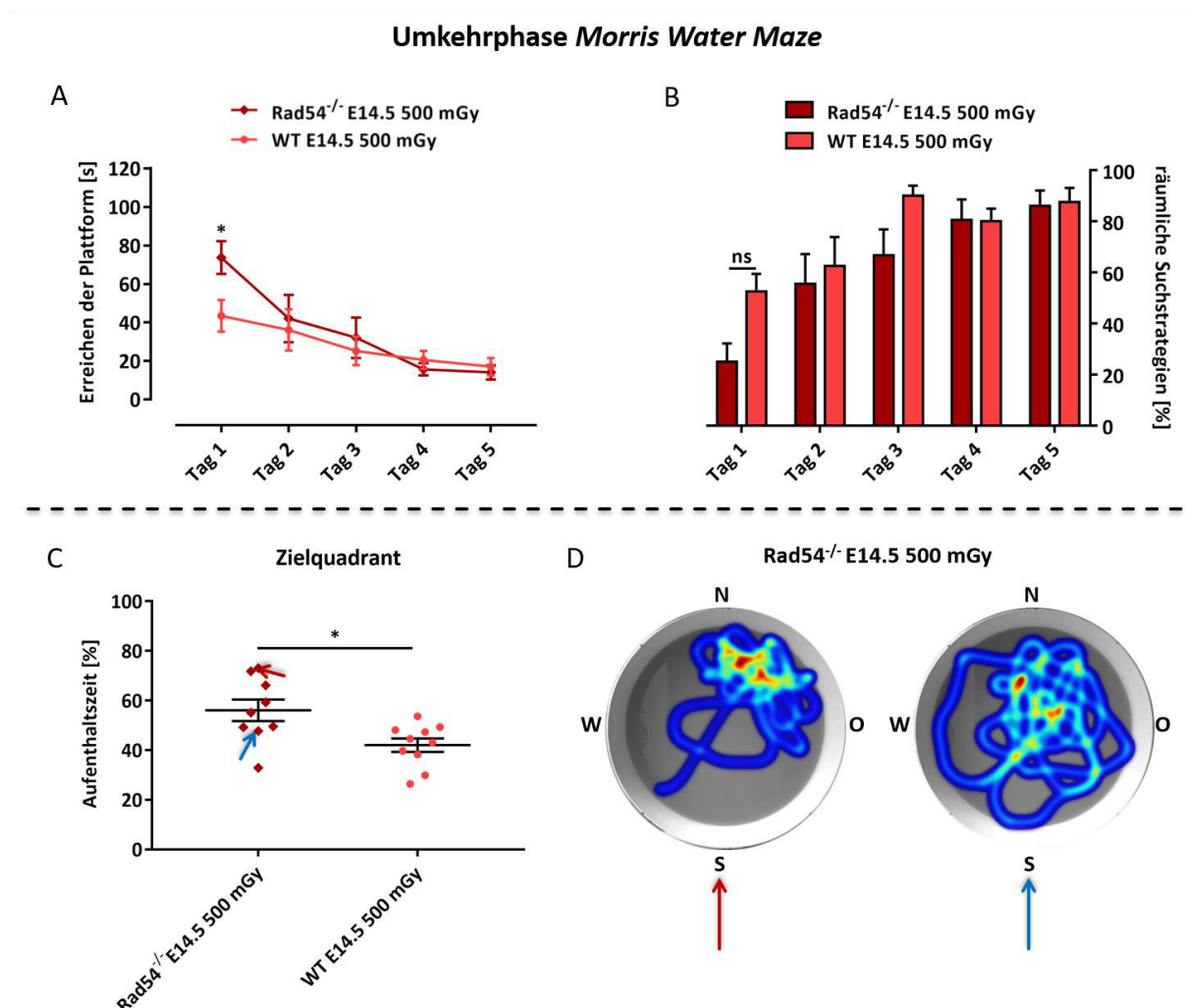


Abbildung 23: Fast identisches Lernverhalten der an E14.5 500 mGy bestrahlten Rad54^{-/-} und Wildtypiere während der Umkehrphase des *MWM*-Tests.

(A) Lernkurven der Rad54^{-/-} und Wildtypiere; aufgetragen sind die mittleren Zeiten der Mäuse um die Plattform zu erreichen. (B) Durchschnittlicher Einsatz räumlicher Suchstrategien während der Umkehrphase des *MWM*-Tests. (C, D)

Probestest der Umkehrphase. (C) Streudiagramm der Aufenthaltszeiten der Tiere im Zielquadranten (NO). Pfeile weisen Tiere aus, die überdurchschnittlich viel (rot) bzw. unterdurchschnittlich wenig (blau) Zeit im Zielquadranten verbracht haben, mit den dazugehörigen Schwimmpfaden (D), rot markierte Stellen verweisen auf eine lange Aufenthaltszeit, blaue Stellen auf eine kurze. (A - C) Abweichungen vom Mittelwert entsprechen dem SEM. Signifikanzen wurden mit dem Sidak-Mehrfachvergleichstest (A, B) und dem ungepaarten t-Test (C) ermittelt, $p > 0,1234$ (ns), $p < 0,0332$ (*). Rad54^{-/-} E14.5 500 mGy n= 9, WT E14.5 500 mGy n= 10.

Das Lerndefizit der Rad54^{-/-} Mäuse überdauerte allerdings nur den ersten Tag der Umkehrphase. Ab dem zweiten Tag erreichten die 500 mGy bestrahlten Rad54^{-/-} Mäuse das Niveau der 500 mGy bestrahlten Wildtypiere. Am sechsten Tag zum Probeversuch, hielten sich die Rad54^{-/-} Tiere sogar signifikant länger im Zielquadranten auf als die Wildtypiere (Rad54^{-/-} = $56,1 \pm 4,3$ %, WT = $42 \pm 2,7$ %) (Abb. 23 C). Alle Tiere der Rad54^{-/-} Gruppe favorisierten deutlich den nordöstlichen Zielquadranten, wobei einige Tiere gezielter nach der Plattform suchten (roter Pfeil) und einige Tiere weniger gezielt (blauer Pfeil) (Abb. 23 D). Wie schon die Ergebnisse der an E14.5 sham bestrahlten Tiere vermuten ließen, wiesen auch die Daten der 500 mGy bestrahlten Rad54^{-/-} Tiere daraufhin, dass die Rad54^{-/-} Mäuse eine besondere Beeinträchtigung, im Einsatz der geeigneten Suchstrategie und der Bestimmung der genauen Plattformposition, hatten.

Insgesamt zeigte der Vergleich der an E14.5 sham bzw. 500 mGy bestrahlten Rad54^{-/-} und Wildtypiere, dass weder die Deletion des Reparaturproteins Rad54 noch die Röntgenbestrahlung einen Einfluss auf die motorische Entwicklung oder die Entwicklung eines normalen Explorationsverhaltens bei den Tieren hatte. Allerdings bewirkte die Deletion des Reparaturproteins Rad54 eine erhebliche Beeinträchtigung des räumlichen Denkvermögens in den Mäusen. Eine ebenso große Beeinträchtigung des räumlichen Denkvermögens löste auch die 500 mGy Bestrahlung an E14.5 bei den Wildtypieren aus. Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass ein defektes DNS-Reparatursystem die gleichen Auswirkungen auf das Lernverhalten haben kann, wie eine niedrigdosierte Röntgenbestrahlung zum E14.5 Stadium.

Um diese Hypothese zu überprüfen wurden ebenso die Rad54^{-/-} und Wildtypiere miteinander verglichen, die zum frühen postnatalen Entwicklungsstadium sham bzw. mit 500 mGy bestrahlt wurden.

4.3.4.4 Vergleich der an p10 sham bestrahlten Wildtyp- und Rad54^{-/-} Tiere im MWM-Test

Die initiale Phase des MWM-Tests deckte ein signifikantes Lerndefizit bei den an p10 sham bestrahlten Rad54^{-/-} Tieren auf. So benötigten die Tiere ab dem zweiten bis zum fünften Tag der initialen Phase mindestens doppelt so viel Zeit um die Plattform zu erreichen, als die an p10 sham bestrahlten Wildtypiere (Tag 2: Rad54^{-/-} = $83,5 \pm 8,8$ s, WT = $37,2 \pm 4$ s, Tag 3: Rad54^{-/-} = $89,1 \pm 9,5$ s, WT = $26,3 \pm 8,4$ s, Tag 4: Rad54^{-/-} = $61,8 \pm 11$ s, WT = $27,4 \pm 8,7$ s, Tag 5: Rad54^{-/-} = $59,6 \pm 13,3$ s, WT = $23,9 \pm 4,3$ s) (Abb. 24 A). Die signifikanten Beeinträchtigungen im Auffinden der Plattform standen im engen

Zusammenhang mit dem fehlenden Einsatz von räumlichen Suchstrategien bei den Rad54^{-/-} Mäusen. So setzten z.B., die Rad54^{-/-} Tiere am zweiten Tag der initialen Phase viermal weniger räumliche Suchstrategien ein als die Wildtypiere (Rad54^{-/-} = 17,5±6,5 %, WT= 70±5 %). Selbst am fünften Tag setzten die Rad54^{-/-} Tiere 37,5 % weniger räumliche Suchstrategien ein als die Wildtypiere (Rad54^{-/-} = 47,5±12,1 %, WT= 85±4,1 %) (Abb. 24 B).

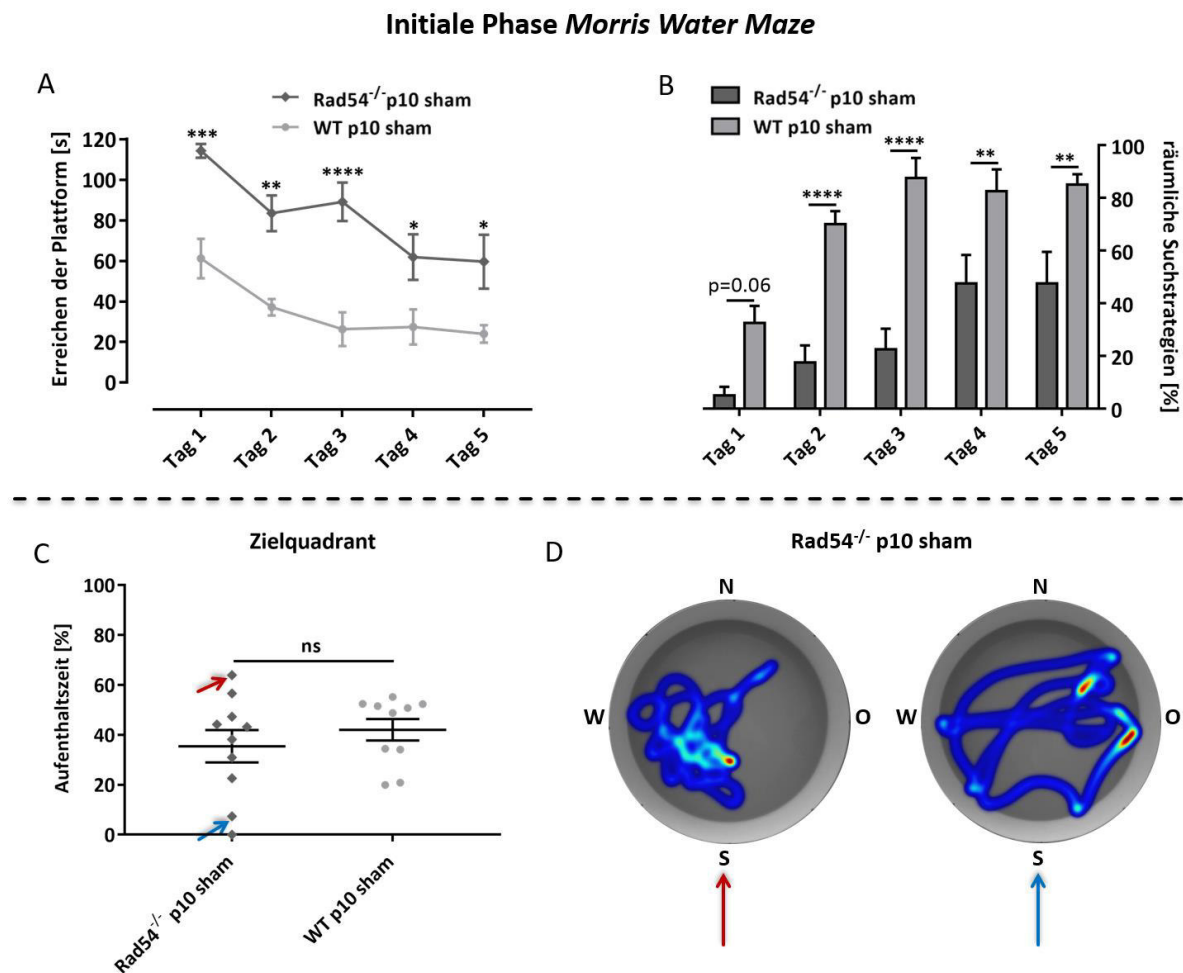


Abbildung 24: Stark beeinträchtigt Lernverhalten der an p10 sham bestrahlten Rad54^{-/-} Tiere während der initialen Phase des *MWM*-Tests.

(A) Lernkurven der Rad54^{-/-} und Wildtypiere; aufgetragen sind die mittleren Zeiten der Mäuse um die Plattform zu erreichen. (B) Durchschnittlicher Einsatz räumlicher Suchstrategien während der initialen Phase des *MWM*-Tests. (C, D) Probeversuch der initialen Phase. (C) Streudiagramm der Aufenthaltszeiten der Tiere im Zielquadranten (SW). Pfeile weisen Tiere aus die überdurchschnittlich viel (rot) bzw. unterdurchschnittlich wenig (blau) Zeit im Zielquadranten verbracht haben, mit den dazugehörigen Schwimmpfaden (D), rot markierte Stellen verweisen auf eine lange Aufenthaltszeit, blaue Stellen auf eine kurze. (A - C) Abweichungen vom Mittelwert entsprechen dem SEM. Signifikanzen wurden mit dem Sidak-Mehrfachvergleichstest (A, B) und dem ungepaarten t-Test (C) ermittelt; $p > 0,1234$ (ns), $p < 0,0332$ (*), $p < 0,0021$ (**), $p < 0,0002$ (***), $p \leq 0,0001$ (****). Rad54^{-/-} p10 sham $n = 10$, Wildtyp p10 sham $n = 10$.

Erst zum Probeversuch am sechsten Tag der initialen Phase, konnten keine signifikanten Unterschiede mehr zwischen Wildtyp- und Rad54^{-/-} Mäusen ausgemacht werden. Beide Gruppen hielten sich überwiegend im Zielquadranten auf (Rad54^{-/-} = 35,4±6,5 %, WT= 42±4,3 %). Wobei wieder eine große Streuung in der Gruppe der Rad54^{-/-} Tiere ausgemacht werden konnte. So gab es Tiere die

überdurchschnittlich viel Zeit (roter Pfeil= 64 %), und Tiere die unterdurchschnittlich wenig Zeit (blauer Pfeil= 7,4 %) im Zielquadranten verweilen (Abb. 24 C, D).

Die anschließende Umkehrphase des *MWM*-Tests deckte ein anfängliches Lerndefizit der *Rad54*^{-/-} Tiere auf, welches sich im Laufe der Trainingsphase aufhob. So benötigten die *Rad54*^{-/-} Tiere in den ersten zwei Tagen der Umkehrphase signifikant mehr Zeit die Plattform zu erreichen, als die Wildtypiere (Tag 1: *Rad54*^{-/-} = 96,5±11,1 s, WT= 54,1±11,1 s; Tag 2: *Rad54*^{-/-} = 68,3±15,6 s, WT= 26,7±9 s) (Abb. 25 A). Auch der Einsatz von räumlichen Suchstrategien war bei den *Rad54*^{-/-} Tieren in den ersten drei Tagen signifikant reduziert (Tag 1: *Rad54*^{-/-} = 12,5±6,7 %, WT= 47,5±10,8 %, Tag 2: *Rad54*^{-/-} = 37,5±14,6 %, WT= 80±7,3 %, Tag 3: *Rad54*^{-/-} = 45±8,2 %, WT= 80±11,7 %) (Abb. 25 B).

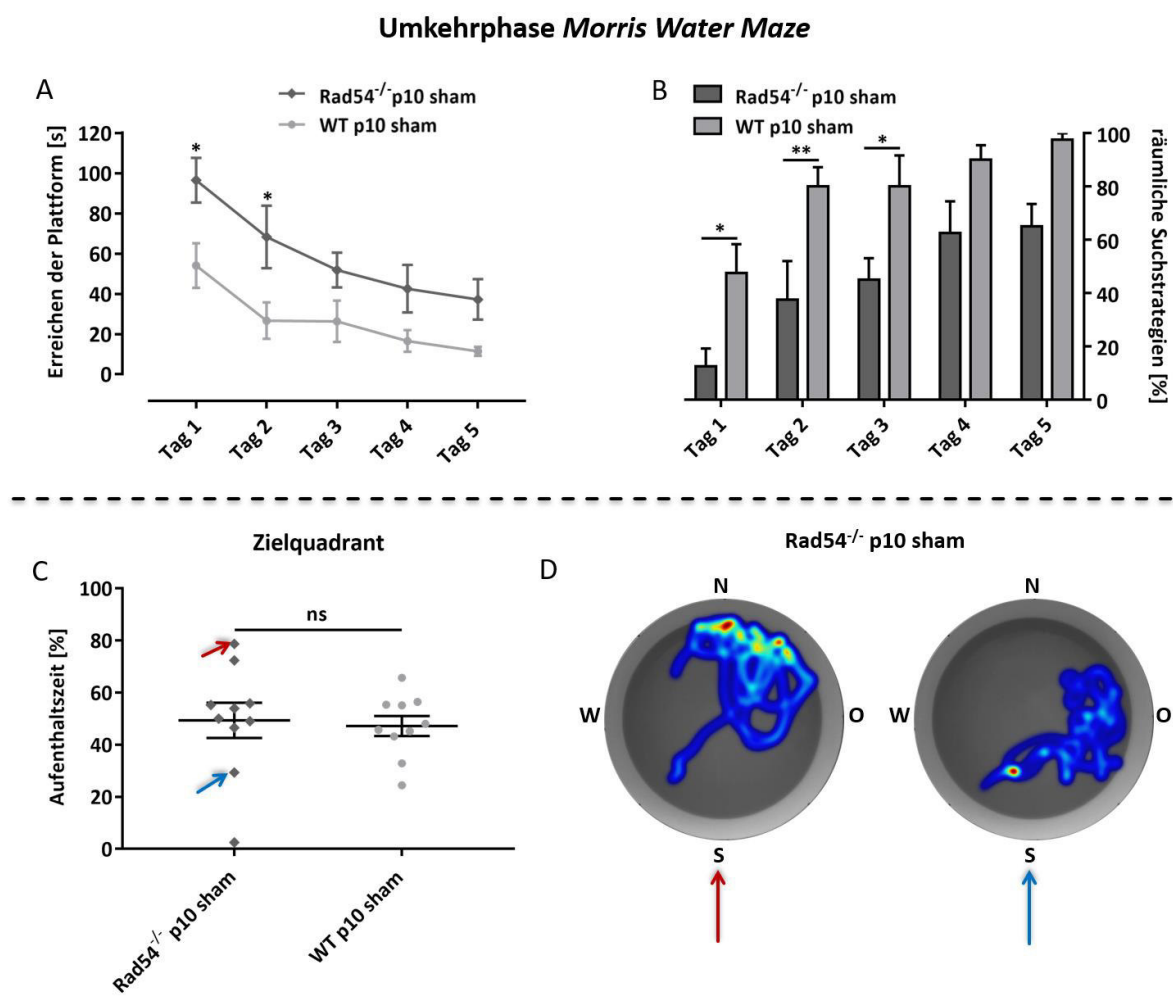


Abbildung 25: Anhaltendes beeinträchtigtes Lernverhalten der an p10 sham bestrahlten *Rad54*^{-/-} Mäuse während der Umkehrphase des *MWM*-Tests.

(A) Lernkurven der *Rad54*^{-/-} und Wildtypiere; aufgetragen sind die mittleren Zeiten der Mäuse um die Plattform zu erreichen. (B) Durchschnittlicher Einsatz räumlicher Suchstrategien während der Umkehrphase des *MWM*-Tests. (C, D) Probestest der Umkehrphase. (C) Streudiagramm der Aufenthaltszeiten der Tiere im Zielquadranten (NO). Pfeile weisen Tiere aus, die überdurchschnittlich viel (rot) bzw. unterdurchschnittlich wenig (blau) Zeit im Zielquadranten verbracht haben, mit den dazugehörigen Schwimmpfaden (D), rot markierte Stellen verweisen auf eine lange Aufenthaltszeit, blaue Stellen auf eine kurze. (A - C) Abweichungen vom Mittelwert entsprechen dem SEM. Signifikanzen wurden mit dem Sidak-

Mehrfachvergleichstest (A, B) und dem ungepaarten t-Test (C) ermittelt; $p > 0,1234$ (ns), $p < 0,0332$ (*), $p < 0,0021$ (**). Rad54^{-/-} p10 sham n= 10, Wildtyp p10 sham n= 10.

Während des Probeversuches der Umkehrphase konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen ausgemacht werden. Sowohl die Rad54^{-/-} als auch die Wildtypmäuse hielten sich überwiegend im Zielquadranten auf (Rad54^{-/-} = 49,4±6,7 %, WT= 47,2±3,8 %). Auch am letzten Tag der Umkehrphase gab es Tiere unter den Rad54^{-/-} Mäusen, die überdurchschnittlich viel Zeit (roter Pfeil= 78,7 %) bzw. unterdurchschnittlich wenig Zeit (blauer Pfeil= 29,3 %) im nordöstlichen Zielquadranten verbrachten (Abb. 25 C, D).

4.3.4.5 Vergleich der an p10 500 mGy bestrahlten Wildtyp- und Rad54^{-/-} Tiere im MWM-Test

Die initiale Phase des MWM-Tests zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den an p10 500 mGy bestrahlten Wildtyp- und Rad54^{-/-} Tieren. Die Zeiten des Erreichens der Plattform waren in beiden Gruppen sehr ähnlich. So benötigten beispielsweise die Rad54^{-/-} Tiere am zweiten Tag der initialen Phase im Mittel 94,8±11 Sekunden um die Plattform zu finden, die Wildtyptiere 71,4±9 s. Am fünften Tag der initialen Phase waren, in beiden Gruppen, die durchschnittlichen Zeiten zum Erreichen der Plattform, fast identisch (Rad54^{-/-} = 58,6±14,5 s, WT= 59,6±11,8 s) (Abb. 26 A).

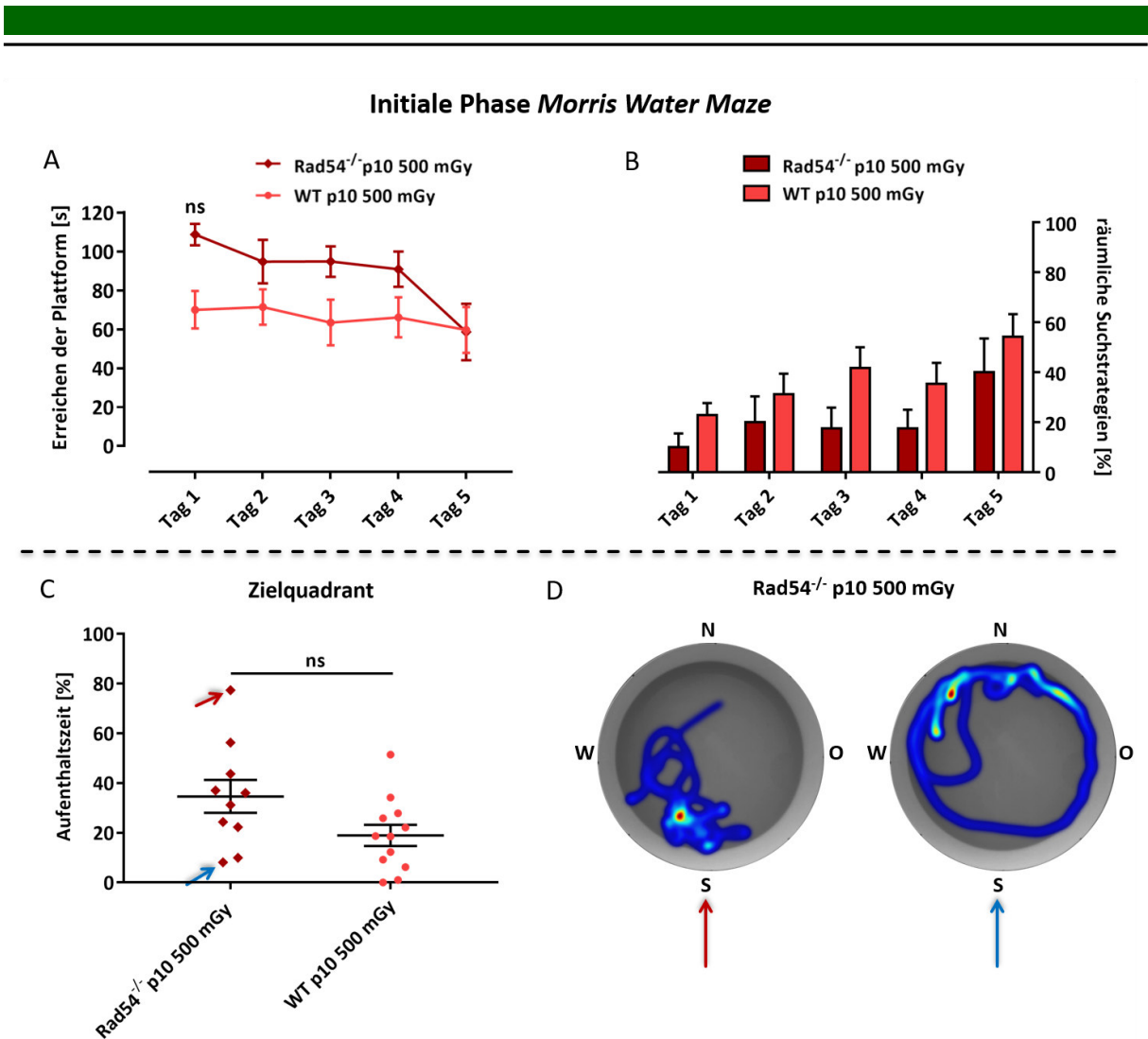


Abbildung 26: Fast identisches Lernverhalten der an p10 500 mGy bestrahlten Rad54^{-/-} und Wildtypiere während der initialen Phase des MWM-Tests.

(A) Lernkurven der Rad54^{-/-} und Wildtypiere; aufgetragen sind die mittleren Zeiten der Mäuse um die Plattform zu erreichen. (B) Durchschnittlicher Einsatz räumlicher Suchstrategien während der initialen Phase des MWM-Tests. (C, D) Probestest der initialen Phase. (C) Streudiagramm der Aufenthaltszeiten der Tiere im Zielquadranten (SW). Pfeile weisen Tiere aus, die überdurchschnittlich viel (rot) bzw. unterdurchschnittlich wenig (blau) Zeit im Zielquadranten verbracht haben, mit den dazugehörigen Schwimmpfaden (D), rot markierte Stellen verweisen auf eine lange Aufenthaltszeit, blaue Stellen auf eine kurze. (A - C) Abweichungen vom Mittelwert entsprechen dem SEM. Es konnten keine signifikanten Unterschiede mit dem Sidak-Mehrfachvergleichstest (A, B) und dem ungepaarten t-Test (C) festgestellt werden; $p > 0,1234$ (ns). Rad54^{-/-} p10 500 mGy $n = 10$, Wildtyp p10 500 mGy $n = 12$.

Die Wahl der Suchstrategien unterschied sich zwischen den Wildtyp- und Rad54^{-/-} Tieren ebenfalls nicht signifikant. Bis zum fünften Tag setzten weder die Wildtyp-, noch die Rad54^{-/-} Mäuse im Schnitt mehr als 54,2 % räumliche Suchstrategien ein um die Plattform zu erreichen (Tag 5: Rad54^{-/-} = $40 \pm 13,5$ %, WT = $54,2 \pm 9$ %) (Abb. 26 B). Auch am letzten Tag der initialen Phase konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt. Sowohl Rad54^{-/-} als auch Wildtypiere verbrachten im Mittel, auffällig wenig Zeit im Zielquadranten (Rad54^{-/-} = $34,6 \pm 6,6$ %, WT = $19 \pm 4,3$ %) (Abb. 26 C). Wobei auch hier ein Tier innerhalb der Rad54^{-/-} Gruppe überdurchschnittlich viel Zeit im

Zielquadranten verbrachte (roter Pfeil= 77,4 %) und ein Tier unterdurchschnittlich wenig Zeit (blauer Pfeil= 8,1 %), Dessen Schwimmpfad verwies zudem auf eine thigmotaktische Verhaltensweise (Abb. 26 D – vgl. Abb. 8).

Die anschließende Umkehrphase deckte ebenfalls keine Unterschiede im Lernverhalten zwischen 500 mGy bestrahlten Rad54^{-/-} und gleichbehandelten Wildtyptieren auf (Abb. 27).

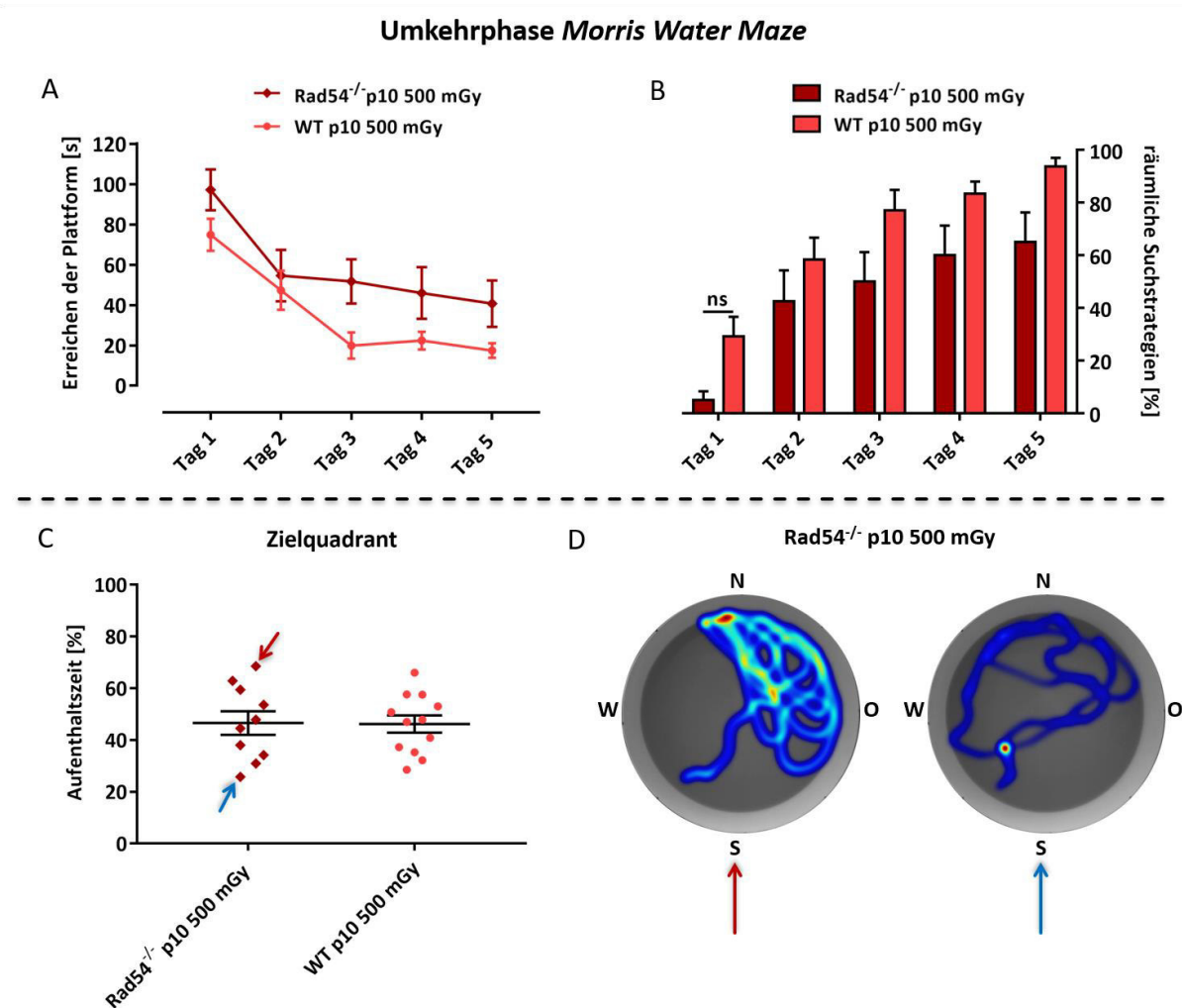


Abbildung 27: Fast identisches Lernverhalten der an p10 500 mGy bestrahlten Rad54^{-/-} und Wildtyptiere während der Umkehrphase des *MWM*-Tests.

(A) Lernkurven der Rad54^{-/-} und Wildtypiere; aufgetragen sind die mittleren Zeiten der Mäuse um die Plattform zu erreichen. (B) Durchschnittlicher Einsatz räumlicher Suchstrategien während der Umkehrphase des *MWM*-Tests. (C, D) Probetest der Umkehrphase. (C) Streudiagramm der Aufenthaltszeiten der Tiere im Zielquadranten (NO). Pfeile weisen Tiere aus die überdurchschnittlich viel (rot) bzw. unterdurchschnittlich wenig (blau) Zeit im Zielquadranten verbracht haben, mit den dazugehörigen Schwimmpfaden (D), rot markierte Stellen verweisen auf eine lange Aufenthaltszeit, blaue Stellen auf eine kurze. (A - C) Abweichungen vom Mittelwert entsprechen dem SEM. Es konnten keine signifikanten Unterschiede mit dem Sidak-Mehrfachvergleichstest (A, B) und dem ungepaarten t-Test (C) festgestellt werden; $p \geq 0,1234$ (ns). Rad54^{-/-} p10 500 mGy $n = 10$, Wildtyp p10 500 mGy $n = 12$.

Sowohl der Verlauf der Lernkurven als auch der Einsatz an räumlichen Suchstrategien unterschied sich über den fünftägigen Zeitraum der Umkehrphase nicht zwischen den Gruppen. So erreichten z.B.

die Rad54^{-/-} Tiere die Plattform am zweiten Tag im Schnitt in 54,6±12,8 s und setzten dabei 42,5±11,8 % räumliche Suchstrategien ein, die Wildtyp-tiere benötigten am gleiche Tag 47,3±9,7 s um die Plattform zu erreichen und wählten im Schnitt 58,3±8,3 % räumliche Suchstrategien (Abb. 27 A, B).

Im Probeversuch konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp- und Rad54^{-/-} Tieren ausgemacht werden. Beide Gruppen hielten sich durchschnittlich gleich lang im nordöstlichen Zielquadranten auf (Rad54^{-/-}= 46,6±4,6 %, WT= 46,2±3,3 %). Obwohl es auch hier Tiere aus der Rad54^{-/-} Gruppe gab, die viel Zeit (roter Pfeil= 68,6 %) und Tiere die wenig Zeit (blauer Pfeil= 25,8%) im Zielquadranten verbrachten, blieb eine große Streuung um den Mittelwert, wie es im Probeversuch der initialen Phase der Fall war, aus (vgl. Abb. 26 C mit 27 C).

Der Vergleich der an p10 sham bestrahlten Wildtyp- und Rad54^{-/-} Tiere deckte ein signifikantes Lerndefizit in der Gruppe der Rad54^{-/-} Tiere auf. Dieses Lerndefizit äußerte sich in einer erhöhten Zeit die versteckte Plattform im *MWM* auszumachen und den stark reduzierten Einsatz an räumlichen Suchstrategien. Diese Beobachtungen deckten sich mit den Ergebnissen der an E14.5 sham bestrahlten Rad54^{-/-} Tiere. Auch die an E14.5 sham bestrahlten Rad54^{-/-} Tiere zeigten ein starkes Lerndefizit im Vergleich zu den gleichbehandelten Wildtyp-tieren. Die Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass die Deletion des Reparaturproteins Rad54 zu einer beeinträchtigten Gedächtnisleistung in den Mäusen führte. Das Ausmaß dieser beeinträchtigten Gedächtnisleistung war vergleichbar mit der Beeinträchtigung, welche durch Niedrigdosisstrahlung in Wildtyp-tieren ausgelöst wurde. So glichen sich die Lernkurven der an p10 500 mGy bestrahlten Wildtyp-tieren mit den der an p10 500 mGy bestrahlten Rad54^{-/-} Tiere. Die gleichen Ergebnisse konnten bei den an E14.5 500 mGy bestrahlten Wildtyp- und Rad54^{-/-} Mäusen festgestellt werden.

Interessanterweise potenzierte sich der Effekt, des verringerten Denkvermögens durch die Niedrigdosisbestrahlung, in den Rad54^{-/-} Tieren nicht. Um herauszufinden ob die Deletion des Reparaturproteins Rad54^{-/-} selbst zu einem veränderten morphologischen Aufbau des Hippocampus führte und diese Veränderungen Grund für die verminderte Lernfähigkeit der Tiere waren, wurden im Folgenden histologische Untersuchungen des Hippocampus durchgeführt.

4.3.5 Histologische Analyse der DCX positiven Zellen im *Gyrus dentatus* der Wildtyp- und Rad54^{-/-} Tiere

Das räumliche Gedächtnis wird gebildet und verschaltet im Hippocampus¹⁰⁷. Insbesondere der *Gyrus dentatus* spielt innerhalb des Hippocampus, bei der Integration junger Neurone in das vorhandene neuronale Netzwerk, eine entscheidende Rolle. Während der adulten Neurogenese migrieren junge

¹⁰⁷ Tulving und Markowitsch 1998; Eichenbaum 2004; Buzsáki und Moser 2013.

Neurone in den *Gyrus dentatus* und bilden sich dort zu reifen Neuronen aus. Dieser Prozess wird verstärkt und ist gleichzeitig essentiell für das Lernen und die Gedächtnisbildung¹⁰⁸. Aufgrund dessen wurden Kryostatschnitte der Hippocampi-Region der Rad54^{-/-} Tiere angefertigt und die Anzahl junger Neurone, welche exklusiv das Mikrotubuli-assoziierte Protein *Doublecortin* (DCX) exprimieren, in den Gyrus dentati bestimmt.

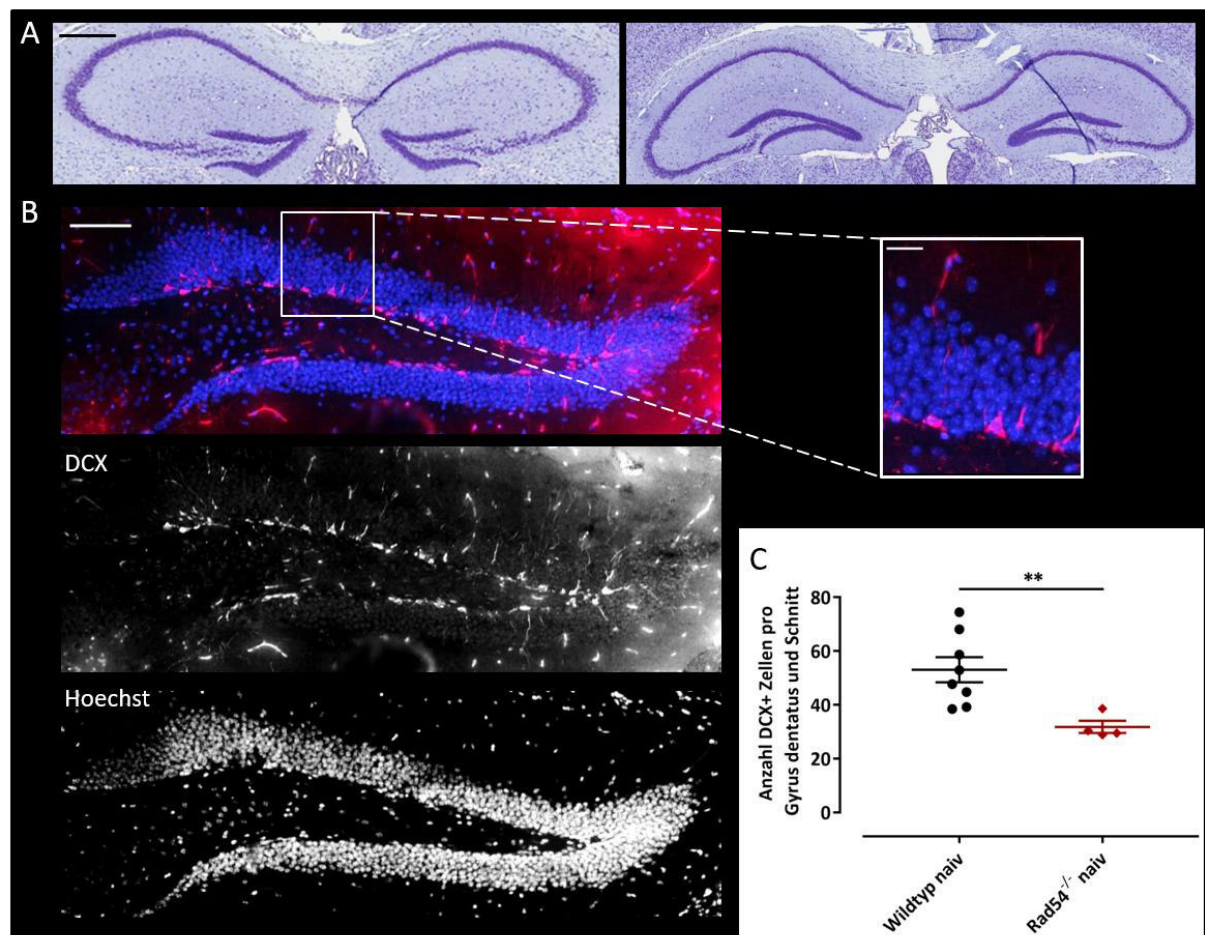


Abbildung 28: Naive Rad54^{-/-} Tiere exprimierten signifikant weniger DCX positive Zellen als Wildtypiere.

(A) Nissl Färbung Hippocampi einer Rad54^{-/-} Maus im Bregma Bereich -1,34 (links) und -2,46 (rechts). Der Maßstab entspricht 500 µm. (B) Immunfluoreszenzfärbung eines *Gyrus dentatus* einer naiven Rad54^{-/-} Maus. *Doublecortin* ist in Rot, Hoechst33342 in Blau dargestellt. Der Maßstab im Vollbild beträgt 100 µm, im Ausschnitt 25 µm. (C) Durchschnittliche Anzahl DCX positiver Zellen/ *Gyrus dentatus*/ Schnitt. Rad54^{-/-} n= 4 Tiere (pro Tier 8-10 *Gyrus dentatus*), Wildtyp n= 8 Tiere (pro Tier 8-10 *Gyrus dentatus*). Abweichungen vom Mittelwert entsprechen dem SEM. Die Signifikanz wurde über den ungepaarten t-Test ermittelt, p< 0,0021 (**).

Die Analyse der *Gyrus dentatus* der naiven Rad54^{-/-} und Wildtypmäuse ergab eine signifikante Reduktion an DCX positiven Zellen in den Rad54^{-/-} Tieren. Während die Wildtypiere im Mittel 53,1±4,7 DCX (+) Zellen pro *Gyrus dentatus* und Schnitt exprimierten, waren es bei den Rad54^{-/-} Tieren nur 31,9±2,3 DCX (+) Zellen (Abb. 28 C).

¹⁰⁸ Gonçalves et al. 2016; Deng et al. 2010; Alam et al. 2018.

Selbst ohne Strahlenbelastung wiesen die Rad54^{-/-} Tiere eine signifikante Reduktion an jungen Neuronen im Hippocampus auf. Um die Auswirkung der Niedrigdosisbestrahlung auf die Anzahl der DCX positiven Zellen zu untersuchen wurden ebenfalls Kryostatschnitte der an p10 und E14.5 500 mGy bestrahlten Rad54^{-/-} und Wildtyp Tiere angefertigt. Aus Abbildung 29 A geht hervor, dass eine Niedrigdosisbestrahlung zu den Entwicklungszeitpunkten E14.5 und p10 eine Reduktion der DCX positiven Zellen, in den Rad54^{-/-} und Wildtyp Tieren zur Folge hatte. Allerdings war die strahleninduzierte Reduktion der jungen Neuronen in den Rad54^{-/-} Mäusen unabhängig vom Entwicklungsstadium. Im Gegensatz zu der Reduktion der jungen Neuronen in den Wildtyp Tieren: Die Reduktion an DCX positiven Zellen war nach einer Niedrigdosisbestrahlung zum E14.5 Stadium signifikant höher als die Reduktion an Zellen im p10 Stadium (Abb. 29 B).

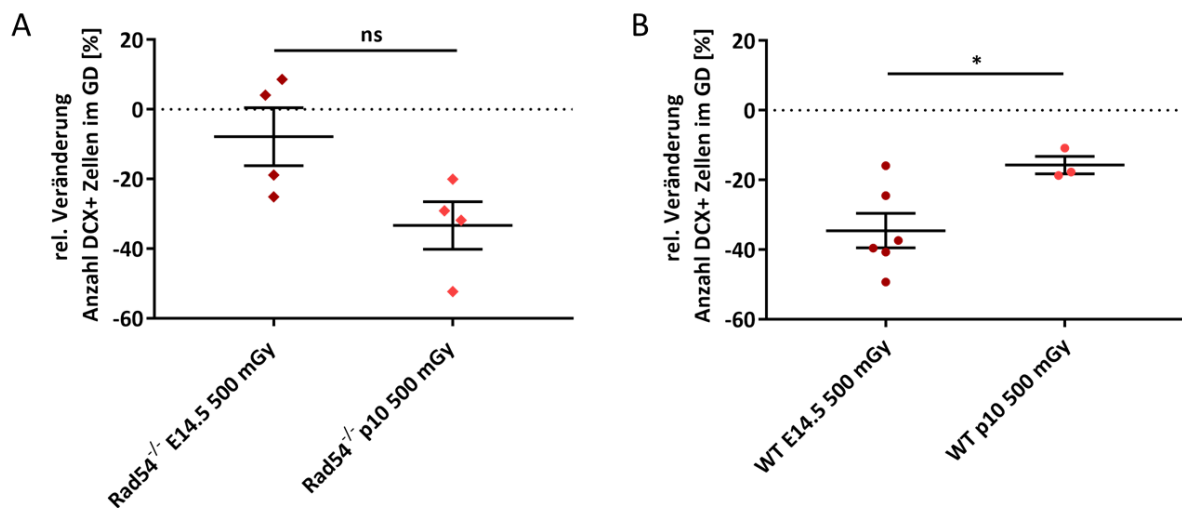


Abbildung 29: Bestrahlungszeitpunkt hatte keinen Einfluss auf die Anzahl der DCX positiven Zellen in Rad54^{-/-} Mäusen.

Relative Veränderung der Anzahl DCX positiver Zellen pro *Gyrus dentatus* und Schnitt der E14.5 und p10 500 mGy bestrahlten Rad54^{-/-} (A) und Wildtyp Tiere (B). Rad54^{-/-} E14.5 500 mGy n=4 (pro Tier 8-10 Gyrus dentati), p10 500 mGy n= 4 (pro Tier 8-10 Gyrus dentati), Wildtyp E14.5 500 mGy n= 6 (pro Tier 8-10 Gyrus dentati), p10 500 mGy n= 3 (pro Tier 8-10 Gyrus dentati). Abweichungen vom Mittelwert entsprechen dem SEM. Signifikanzen wurden mit dem ungepaarten t-Test ermittelt, p> 0,1234 (ns); p< 0,0332(*).

4.4 Diskussion Kap I

Zielsetzung dieses Kapitels war es herauszufinden, ob eine defekte DNS DSB-Reparatur den negativen Effekt der Niedrigdosisbestrahlung auf die kognitive Entwicklung weiter verstärken würde. Hinweise auf eine durch Niedrigdosisbestrahlung beeinträchtigte kognitive Entwicklung konnten sowohl in *in vivo* Experimenten, als auch in epidemiologischen Studien gefunden werden. So konnten Hall und Kollegen in einer groß angelegten Studie 2004 herausfinden, dass schwedische Jungen, die im frühen Kleinkindalter eine Strahlentherapie gegen *cutaneous hemangioma* am Kopf erhalten hatten, kognitive Auffälligkeiten im Alter von 18 bzw. 19 Jahren aufwiesen. So waren Lernfähigkeit und logisches Denken beeinträchtigt¹⁰⁹. Beeinträchtigungen im Denkvermögen erlitten auch Kinder, die zwischen 1950 und 1960 in Israel in Folge einer *tinea capitis* Erkrankung mit einer Niedrigdosisbestrahlung am Kopf behandelt worden waren¹¹⁰. Eriksson und Kollegen beobachteten in 2 bzw. 4 Monate alten Mäusen eine Veränderung im spontanen Verhalten, nachdem diese im frühen postnatalen Stadium mit 500 mGy bestrahlt wurden¹¹¹. Auch Axel Klink analysierte das Verhalten von Wildtypmäusen (C57BL/J6) im Alter von 2 Monaten, nachdem diese zu den Entwicklungszeitpunkten E14.5 oder p10 mit niedrigdosierter Röntgenstrahlung bestrahlt wurden. Bei einer Dosis von 500 mGy zeigen die adulten Tiere signifikante Defizite im räumlichen Lernen¹¹². Besonders in kritischen Entwicklungsphasen wie dem Embryonalstadium, in welchem das gesamte neuronale System stark proliferiert und gleichzeitig angelegt wird¹¹³, oder im frühen postnatalen Stadium, in welchem das Gehirn weiter expandiert, Gliogenese und dendritische Auswüchse ihren Höhepunkt erreichen¹¹⁴, ist das neuronale Netzwerk radiosensitiv¹¹⁵. Da DNS DSBs die folgenreichsten Schäden darstellen, die in der Zelle durch Röntgenbestrahlung auftreten, ist eine intakte DNS-Schadensantwort von enormer Bedeutung. Insbesondere stark proliferierende Zellen sind auf eine fehlerfreie Reparatur strahleninduzierter DNS DSBs angewiesen, da sie ihr gesamtes Genom transkribieren müssen. Nicht oder fehlerhaft reparierte Brüche führen zu entarteten oder apoptotischen Zellen¹¹⁶. Eine komplett fehlerfreie Reparatur kann nur über die HR gewährleistet werden. Daher war die Hypothese, dass ein HR-reparaturdefizientes System wie das Rad54^{-/-} Mausmodell die Effekte der Niedrigdosisbestrahlung potenzieren würde. Tatsächlich konnten aber

¹⁰⁹ Hall et al. 2004.

¹¹⁰ Ron et al. 1982.

¹¹¹ Eriksson et al. 2016.

¹¹² BNA 2017 Festival of Neuroscience: Abstract Book 2017; Laura Trundle | Fusion Conferences.

¹¹³ Semple et al. 2013.

¹¹⁴ Semple et al. 2013; Eriksson 1997.

¹¹⁵ Otake und Schull 1984; Santis et al. 2007; Otake und Schull 1998; Yoshimaru et al. 1995.

¹¹⁶ Jackson 2002.

keine signifikanten Unterschiede zwischen den 500 mGy und sham bestrahlten Rad54^{-/-} Tieren im *MWM*-Test festgestellt werden (s. Abb. 11 - 18). Stattdessen stellte sich heraus, dass schon die sham bestrahlten Rad54^{-/-} Tiere im Vergleich zu den sham bestrahlten Wildtyp-Tieren ein signifikantes Lerndefizit in der initialen Phase des *MWM*-Tests aufweisen (s. Abb. 20, 24).

4.4.1 Der Verlust des Rad54-Proteins führt zu Defekten in der adulten Neurogenese

Eine funktionierende DNS-Reparatur ist ausschlaggebend für eine normale Entwicklung. Nicht reparierte Brüche und Mutationen zum Zeitpunkt der frühen Entwicklung, können enorme Effekte auf das sich entwickelnde Nervensystem haben¹¹⁷. So ist die schwere Nervenkrankheit *Ataxia teleangiectasia* (AT), welche mit Bewegungs- und Sprachstörungen einhergeht, auf eine Mutation in der Serin/Threonin-Kinase ATM zurückzuführen¹¹⁸. Die ATM Kinase koordiniert die DNS DSB-Reparatur¹¹⁹. Der Verlust des Kernproteins *LIG4* (DNS-Ligase 4) des NHEJ-Reparaturweges, führt hingegen zum *LIG4* Syndrom, bei welchem Mikrozephalie ein Hauptsymptom ist¹²⁰. Das Reparaturprotein Rad54 spielt während der HR eine wichtige Rolle. Es interagiert direkt mit dem überlebenswichtigen Reparaturprotein Rad51¹²¹. Es stimuliert dessen Aktivität¹²² und sorgt ebenso für dessen Wiederaufbereitung¹²³.

Der spezifische Reparaturweg der HR ist besonders während der embryonalen Neurogenese wichtig. Zu diesem Entwicklungszeitpunkt befindet sich der Großteil der Zellen in einem Zustand, der sich durch schnelle und häufige Proliferation auszeichnet¹²⁴. Durch den ständigen Eintritt in den Zellzyklus, steht verhältnismäßig häufig ein Schwesterchromatid als Template für die Reparatur von DNS DSBs zur Verfügung. Dies ist Ausschlagkriterium für die Vermeidung von fehlerhaft reparierten Brüchen, die zur Apoptose oder zu Mutationen führen können¹²⁵. Eine fehlerhafte DNS-Reparatur kann bis zum späten adulten Stadium verheerende Auswirkungen haben. So schreiten im Falle der Nervenkrankheit AT die neurologischen Schäden im Laufe der Entwicklung immer mehr voran: beginnend mit Sprachstörungen im frühen Kindesalter, treten im Alter zunehmend motorische Beeinträchtigungen auf¹²⁶. Ebenso korreliert die erst im fortgeschrittenen Alter aufkommende

¹¹⁷ McKinnon 2013.

¹¹⁸ Biton et al. 2008; Shiloh und Ziv 2013.

¹¹⁹ Bakkenist und Kastan 2003; Wang et al. 2016.

¹²⁰ O'Driscoll et al. 2001.

¹²¹ Raschle et al. 2004.

¹²² Petukhova et al. 1998.

¹²³ Solinger et al. 2002.

¹²⁴ Takeuchi und Nakamura 2014.

¹²⁵ Ranjha et al. 2018; Rothkamm et al. 2003b.

¹²⁶ Nissenkorn und Ben-Zeev 2015; Crawford 1998.

neurodegenerative Krankheit Alzheimer mit einer Reduktion der NHEJ-Effektivität und einer Akkumulation von DNS DSBs in Neuronen¹²⁷. Auch die Lewy-Körper-Demenz korreliert mit einer Akkumulation von DSBs in Neuronen¹²⁸.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Verlust des Reparaturproteins Rad54 zu einer Beeinträchtigung des räumlichen Denkvermögens in adulten Mäusen führt. Diese Beeinträchtigung im Denkvermögen zeigen Wildtypmäuse im gleichen Ausmaß, nachdem sie zu den Entwicklungszeitpunkten E14.5 und p10 mit 500 mGy Röntgenstrahlung bestrahlt worden sind (s. Abb. 22, 26). Offensichtlich führt eine Störung der Neurogenese während sensiblen Phasen, sei es nun extern durch Röntgenbestrahlung oder intern durch Mutationen in Proteinen der HR, zu Defiziten in der Hirnentwicklung.

Im Fall der Niedrigdosisbestrahlung und dem *knock out* des Proteins Rad54 manifestierte sich die gestörte Hirnentwicklung in Form einer spezifischen Beeinträchtigung des räumlichen Denkvermögens. Der Hippocampus spielt eine zentrale Rolle bei der Verschaltung und Verarbeitung von Informationen, die für das räumliche Orientieren und Navigieren unerlässlich sind¹²⁹. Dabei soll die adulte Neurogenese einen entscheidenden Beitrag leisten¹³⁰. Bei der adulten Neurogenese migrieren Stammzellen aus der subgranulären Zone in den *Gyrus dentatus* und differenzieren dabei zu jungen Neuronen¹³¹. Diese jungen Neurone, die exklusiv das Protein *Doublecortin* (DCX) exprimieren¹³², verstärken durch ihre spezifischen Eigenschaften den Lernprozess und die Gedächtnisbildung¹³³. Tatsächlich zeigten die Rad54^{-/-} Tiere eine signifikante Reduktion an DCX positiven Zellen im Vergleich zu den Wildtyptieren. Gleichzeitig wiesen auch die an E14.5 und p10 mit 500 mGy bestrahlten Wildtypmäuse eine Reduktion der jungen Neurone im GD auf.

Ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Verlust an jungen Neuronen im Hippocampus und einer Beeinträchtigung des räumlichen Lernverhaltens wurde schon zuvor diskutiert. So wiesen Rola und Kollegen in C57BL/6J-Mäuse nach, dass eine 500 mGy Bestrahlung im Alter von 21 Tagen zu einem starken Lerndefizit im Alter von 3 Monaten führt. Das beeinträchtigte räumliche Denkvermögen ging gleichzeitig mit einem signifikanten Neuronenverlust einher¹³⁴. Verreet und Kollegen vermuten

¹²⁷ Boerrigter et al. 1992; Adamec et al. 1999; Markesbery und Lovell 2006.

¹²⁸ Love 2001; Ferman und Boeve 2007.

¹²⁹ Tulving und Markowitsch 1998; Eichenbaum 2004; Buzsáki und Moser 2013.

¹³⁰ Alam et al. 2018; Gonçalves et al. 2016; Snyder et al. 2001.

¹³¹ Deng et al. 2010.

¹³² Brown et al. 2003; Couillard-Despres et al. 2005.

¹³³ Gonzalez-Perez und Quiñones-Hinojosa 2012; Alam et al. 2018.

¹³⁴ Rola et al. 2004.

ebenfalls einen Zusammenhang zwischen einer veränderten Hirnmorphologie und negativen Auswirkungen auf das räumliche Lernverhalten. C57BL/6J-Mäuse die im E11-Stadium mit 1 Gy bestrahlt wurden, zeigten 12 Wochen nach der Geburt ein verlangsamtes Lernverhalten im *MWM*-Test. Vier Wochen nach Bestrahlung konnte ebenso eine Reduktion an SOX2 (*engl. sex determining region Y-box2* = Stammzellmarker) positiven Zellen und proliferierenden Zellen (KI67= Proliferationsmarker) festgestellt werden¹³⁵. Des Weiteren konnten kürzlich Zanni und Kollegen zeigen, dass die Bestrahlung von 21 Tage alten C57BL/6-Mäusen mit 4 Gy, 56 Tage nach der Behandlung zu einer Reduktion der DCX-positiven Zellen im *Gyrus dentatus* führt. Gleichzeitig konnte ein Lerndefizit im *MWM*-Test ausgemacht werden¹³⁶.

4.4.2 Die adulte Neurogenese ist ausschlaggebend für komplexes räumliches Lernen

Der Hippocampus ist der Ort der Fusion, Aneignung und Speicherung des deklarativen Gedächtnisses¹³⁷. Dies beinhaltet die Fähigkeit, Ereignisse in einer zeitlichen oder kontextabhängigen Reihenfolge zu ordnen, zu speichern und wieder abzurufen, wenn es die Situation erfordert¹³⁸. Zudem tragen die Verschaltungen des Hippocampus dazu bei, ein Abbild der äußeren Umwelt als innere kognitive Karte zu erstellen¹³⁹. Durch diese ist eine räumliche Orientierung und Navigation in der Umgebung erst möglich¹⁴⁰. Es können zwei Arten der Navigation unterschieden werden: die egozentrische und die allozentrische Navigation. Während die egozentrische Navigation interne Informationen wie die Rückkopplung von Beinbewegungen, die eingesetzte Geschwindigkeit und die eingeschlagene Richtung bzw. Richtungsänderungen vereint und dem dorsalen *Striatum* und umliegenden Strukturen zugeschrieben wird¹⁴¹, ist die allozentrische Navigation von entfernten Orientierungspunkten abhängig, die im Verhältnis zu anderen Orientierungspunkten Informationen zum aktuellen Aufenthaltsort des Organismus enthalten. Diese Art der Navigation ist vom Hippocampus und dem entorhinalen Kortex abhängig¹⁴². Mit Hilfe elektrophysiologischer Analysen konnten die so genannten Ortszellen im Hippocampus ausgemacht werden¹⁴³. Diese Zellen reagieren auf unterschiedliche Umgebungen und formen somit ein Abbild als innere kognitive Karte¹⁴⁴.

¹³⁵ Verreet et al. 2015.

¹³⁶ Zanni et al. 2019.

¹³⁷ Abel und Lattal 2001.

¹³⁸ Squire und Zola 1996.

¹³⁹ O'Keefe und Nadel 1978.

¹⁴⁰ Thompson und Kim 1996.

¹⁴¹ Clark et al. 2018.

¹⁴² Danjo 2020.

¹⁴³ O'Keefe und Dostrovsky 1971.

¹⁴⁴ O'Keefe 1976.

Gitterzellen aus dem entorhinalen Kortex vergrößern durch ihre Signalmuster diese Karte¹⁴⁵. Im Zusammenspiel mit Grenzzellen und Kopfrichtungszellen entsteht schließlich Orientierung im Raum¹⁴⁶. Orientierung basiert somit auf der hochkomplexen Integration Verschaltung von externen und internen Informationen, die verarbeitet, gespeichert und zu gegebener Zeit wieder abgerufen werden müssen. Dieses räumliche Lernen und die Gedächtnisbildung werden in Mäusen häufig mit Hilfe des *MWM*-Tests überprüft¹⁴⁷.

Vorteil des *MWM*-Tests ist, dass gezielt die allozentrische Navigation angesprochen wird¹⁴⁸. Durch den Mangel an proximal gelegenen Hinweisen und fehlenden Geruchsspuren sind die getesteten Mäuse auf distale Orientierungspunkte (= Symbole an den Wänden: s. Kapitel 4.2.6) angewiesen, um die versteckte Plattform zu finden und so aus dem *Maze* zu entkommen. Der Entwickler des *MWM*-Tests konnte zeigen, dass Läsionen am Hippocampus zu einer stark beeinträchtigen allozentrischen Navigation führen¹⁴⁹. In den darauffolgenden Jahren konnte in einer Vielzahl von Studien demonstriert werden, dass auf unterschiedliche Weise hervorgerufene Schädigungen des Hippocampus (Gen-Mutationen von Rezeptoren, pharmakologische Inhibition der Signalübertragung des neuronalen Netzwerkes, etc.) zu Defekten im Lernen und in der Gedächtnisbildung führen¹⁵⁰. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Deletion des Reparaturproteins Rad54 und der damit einhergehende Verlust an jungen Neuronen im *Gyrus dentatus* zu einer erheblichen Beeinträchtigung des räumlichen Denkvermögens führt. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass eine defizitäre adulte Neurogenese die räumliche Orientierung und das räumliche Gedächtnis negativ beeinflusst.

Im adulten Stadium, zeichnen sich neu generierte Neurone, die als Stammzellen aus der subgranulären Zone in den *Gyrus dentatus* einwandern, durch ihre besonders hohe Erregbarkeit aus¹⁵¹. Sie reagieren auf unterschiedliche Stimuli¹⁵², bauen schnell neue synaptische Verbindungen zu Zellen aus anderen Hirnregionen wie dem Hilus und der CA3 Region aus¹⁵³ und weisen zusätzlich einen besonders niedrigen Schwellenwert auf, um Langzeitpotenzierungen (LTPs) auszulösen¹⁵⁴.

¹⁴⁵ Moser et al. 2014.

¹⁴⁶ Sargolini et al. 2006.

¹⁴⁷ D'Hooze und Deyn 2001.

¹⁴⁸ Brandeis et al. 1989.

¹⁴⁹ Morris et al. 1986; Morris et al. 1990.

¹⁵⁰ Moser et al. 1998; Burgess et al. 2002; Penner und Mizumori 2012; Buzsáki und Moser 2013.

¹⁵¹ Mongiat et al. 2009.

¹⁵² Ge et al. 2006; Tashiro et al. 2006.

¹⁵³ Nicoll und Schmitz 2005.

¹⁵⁴ Frey und Morris 1997.

Aufgrund dieser außergewöhnlichen Eigenschaften wird angenommen, dass junge Neurone die kognitive Flexibilität beim Lernen erhöhen¹⁵⁵, temporäre Informationen in Gedächtnisinhalte umwandeln¹⁵⁶ und die Balance zwischen Musterintegration und -trennung aufrechterhalten¹⁵⁷. Allerdings beruhen diese Informationen auf computergestützten Modellen. Die tatsächlichen Aufgaben junger Neurone während des Lernens und der Gedächtnisbildung sind weitestgehend noch unklar. Clelland und Kollegen konnten allerdings zeigen, dass eine Ablation der hippocampalen Neurogenese zu einer spezifischen Beeinträchtigung der räumlichen Musterintegration und -trennung führt. In ihren Experimenten äußerte sich dies dadurch, dass die Mäuse Schwierigkeiten hatten, zwei ähnliche Gedächtnisinhalte (= z.B. zwei ähnliche Muster) voneinander zu unterscheiden¹⁵⁸. Darüber hinaus konnten Creer und Kollegen zeigen, dass eine verstärkte Neurogenese, ausgelöst durch freiwillige physische Aktivität, zu einer Verbesserung der Musterintegration und -trennung führt¹⁵⁹. Die Trennung von ähnlichen räumlichen Gedächtnisinhalten ist ebenso beim erfolgreichen Lernen während des *MWM*-Tests wichtig. Da die Versuchstiere aufgrund der häufigen Änderung der Startposition das Wasserbecken aus vielen verschiedenen, aber sehr ähnlichen Blickrichtungen erfahren, müssen sie ihre Position im Raum aus den distalen Orientierungspunkten (= Hinweise an den Wänden) ableiten. Nur so können sie eine Strategie entwickeln (= räumliche Suchstrategie), um erfolgreich die versteckte Plattform im Becken wiederzufinden. Tatsächlich zeigen die Arbeiten von Dupret und Garthe, dass die Ablation der Neurogenese besonders zu einem verminderten Einsatz von direkten räumlichen Suchstrategien führt. Die Mäuse waren fähig, die versteckte Plattform im *MWM* nach einer gewissen Trainingszeit zu erreichen, allerdings stark verzögert im Vergleich zu den Kontrolltieren. Ein Grund dafür war der seltene Einsatz direkter räumlicher Suchstrategien¹⁶⁰. Der Gleiche Effekt trat bei den in dieser Arbeit untersuchten *Rad54*^{-/-} Tieren auf. So waren diese Tiere zwar in der Lage, die Plattformposition auszumachen, benötigten im Vergleich zu den sham bestrahlten Wildtyptieren allerdings erheblich mehr Zeit, um die Plattform zu erreichen (s. Abb. 20 A). Auffällig ist auch hier, dass die *Rad54*^{-/-} Tiere kaum räumliche Suchstrategien während der Trainingsphase entwickelten (s. Abb. 20 B). Garthe und Kollegen beobachteten zusätzlich eine fehlende Flexibilität beim Lernen in den Neurogenese-defizitären Mäusen. Auch die *Rad54*^{-/-} Tiere zeigten eine anfängliche Lernverzögerung während der Umkehrphase des *MWM*-Tests (Abb. 21 A, B). Offensichtlich sind die jungen Neuronen, welche

¹⁵⁵ Chambers et al. 2004.

¹⁵⁶ Becker und Wojtowicz 2007.

¹⁵⁷ Aimone et al. 2009.

¹⁵⁸ Clelland et al. 2009.

¹⁵⁹ Creer et al. 2010.

¹⁶⁰ Dupret et al. 2008; Garthe et al. 2009.

während der adulten Neurogenese in den *Gyrus dentatus* integriert werden, wichtig, um eine Interferenz zwischen bereits existierenden Repräsentationen der Umwelt und neuen repräsentativen Informationen der aktuellen Umgebung zu verhindern. Das heißt, die adulte Neurogenese ist wichtig, um neue Situationen zu erkennen, zu integrieren und gegebenenfalls bereits existierende Gedächtnisinhalte flexibel zu modifizieren.

Insgesamt bedeutet dies, dass eine Orientierung im Raum durch eine verminderte adulte Neurogenese zwar möglich, die komplexe allozentrische Navigation jedoch stark beeinträchtigt ist.

5 Kapitel II: Auswirkungen strahleninduzierter DNS DSBs in neuronalen Zellen am murinen *in vitro* Modell

5.1 Einleitung Kap II

In vitro Zellsysteme spielen eine große Rolle in der Grundlagen- und klinischen Forschung. Dies ist dadurch begründet, dass sie in einer hohen Vielfältigkeit existieren, stabil kultiviert und relativ einfach manipuliert werden können. Kausale Zusammenhänge zwischen Ursache und Wirkung auszumachen, ist in einem reduzierten System weitaus einfacher als in einem sehr komplexen System, das von vielen äußeren Einflüssen mitbestimmt wird. Die Zelllinie J1 NSZ ist ein solches vereinfachtes Modellsystem der adulten Neurogenese. Generiert wurden die immortalisierten neuronalen Stammzellen aus pluripotenten embryonalen Mausstammzellen¹⁶¹. Es konnte gezeigt werden, dass diese Zelllinie stark der radialen Gliazelllinie, welche im adulten Gehirn in der subventrikulären und subgranulären Zone als adulte Stammzellen residieren, ähneln¹⁶². Sie sind in der Lage, sich symmetrisch zu teilen und selbst zu erneuern. Des Weiteren können sie durch Veränderung der Zellkulturbedingungen zu funktionalen Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten differenziert werden¹⁶³.

5.1.1 Der NHEJ-Reparaturweg und das Reparaturprotein 53BP1

DNS Doppelstrangbrüche (DSBs) sind die erheblichsten Schäden, die in der Zelle durch ionisierende Strahlung ausgelöst werden können¹⁶⁴. Wenn ionisierende Strahlung auf die Zelle trifft, deponiert sie ihre Energie in derselben. Dabei werden Radikale entweder direkt an der DNS durch den Verlust eines Wasserstoffatoms oder in der direkten Umgebung der DNS durch die Radiolyse des Wassers erzeugt (Abb. 30 A). Hydroxylradikale, welche durch die Radiolyse gebildet werden, reagieren mit den Nukleotiden der DNS und bilden am Desoxyribose-Rückgrat Peroxid-Radikale, die in Form von Einzelstrangbrüchen zu chemisch stabilen Schäden führen¹⁶⁵. Mehrere Einzelstrangbrüche in unmittelbarer Nähe führen wiederum zu Doppelstrangbrüchen¹⁶⁶. Siddiqi und Bothe waren der Überzeugung, dass ein einziges Radikal genügt, um einen DSB auszulösen. Dabei soll das Desoxyribose-Radikal, welches durch die Reaktion mit einem Hydroxylradikal entstanden ist, eine Kettenreaktion auslösen: Die Reaktion des Sauerstoffatoms führt zur Bildung eines Peroxid-Radikals,

¹⁶¹ Ying und Smith 2003.

¹⁶² Doetsch 2003; Gonzalez-Perez und Quiñones-Hinojosa 2012.

¹⁶³ Conti et al. 2005.

¹⁶⁴ Ward 1988.

¹⁶⁵ Sonntag 1987.

¹⁶⁶ Ward 1985.

welches einen Einzelstrangbruch auslöst. Das freie Radikal, welches sich am Ende des gebrochenen Stranges gebildet hat, reagiert mit einem Wasserstoffatom der Desoxyribose des komplementären Stranges und bildet dabei ein neues Radikal, das irreversible Schäden im komplementären Strang hervorruft und somit einen zweiten Bruch und damit einen DSB zur Folge hat¹⁶⁷.

Die Zelle hat prinzipiell mehrere Mechanismen um Einzel- und Doppelstrangbrüche zu reparieren. Bei DSBs die durch ionisierende Strahlung ausgelöst wurden handelt es sich allerdings um komplizierte Brüche die entweder über die homologe Rekombination (engl.: *homologous recombination*, HR) oder die nicht-homologe-Endverknüpfung (engl.: *non homologous end joining*, NHEJ) repariert werden müssen. Der NHEJ-Weg ist fehleranfälliger als die HR, weil kein Schwesterchromatid als Template für die Reparatur genutzt werden kann. Für postmitotische Zellen wie reife Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten, die nur noch auf den NHEJ-Weg zurückgreifen können, um ihre DNS DSBs zu reparieren, ist er dennoch essentiell für das Zellüberleben.

Der klassische NHEJ-Weg kann in drei Phasen unterteilt werden, der Erkennung des DNS DSBs, dessen Prozessierung und anschließender Ligation (Abb. 30 B). In eukaryotischen Zellen erkennt das KU70/KU80-Heterodimer Bruchenden von DNS Molekülen und bindet mit einer starken Affinität an diesen¹⁶⁸. Dabei werden die DNS Bruchenden in räumlicher Nähe gehalten und stabilisiert, damit keine weitere Translokation der Enden stattfindet¹⁶⁹. Durch die Bindung an den DNS Enden, verändert sich ebenso die Konformation des KU-Komplexes, sodass es einerseits weitere Reparaturfaktoren rekrutiert und gleichzeitig als Gerüst für diese Faktoren dient¹⁷⁰. Wichtige Reparaturfaktoren sind die Proteine ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*), ATR (*Ataxia Telangiectasia and Rad3 related*) und die DNA-PKcs (engl. *DNA dependent protein kinase, catalytic subunit*) die zur Familie der Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) gehören¹⁷¹. Wenn KU als Komplex mit einem DNS-Ende vorliegt, kann es die DNS-PKcs aktivieren¹⁷². Diese wiederum phosphoryliert nach Aktivierung eine Reihe von weiteren Reparaturproteinen, darunter auch sich selbst und ATM¹⁷³. ATM rekrutiert unter anderem 53BP1 an die Bruchenden. 53BP1 verhindert die Resektion und blockiert die Rekrutierung des HR-Faktors BRCA1 zu den DNS-Enden während der G1 Phase und moduliert somit die Entscheidung über den Reparaturweg mit¹⁷⁴. Bei komplizierten Brüchen phosphoryliert die

¹⁶⁷ Siddiqi und Bothe 1987.

¹⁶⁸ Walker et al. 2001.

¹⁶⁹ Downs und Jackson 2004.

¹⁷⁰ Lieber 2010.

¹⁷¹ Abraham 2004.

¹⁷² Walker et al. 2001; Falck et al. 2005.

¹⁷³ Davis et al. 2014.

¹⁷⁴ Panier und Boulton 2014; Escribano-Díaz et al. 2013; Feng et al. 2013.

DNA-PKcs zusätzlich die Endonuklease Artemis. Der DNA-PKcs-Artemis-Komplex kann verschiedene Arten von DNS Überhängen prozessieren und bereitet so die DNS Bruchenden auf die Religation vor¹⁷⁵. Die Religation erfolgt durch den XRCC4-(*engl. X-ray repair cross-complementing protein 4*) XLF (*engl. XRCC4-like factor*)-LIG4 (*engl. DNA ligase 4*)-Komplex, welcher sich an den KU-DNA-PKcs-Komplex verankert¹⁷⁶. Das Protein XRCC4 aktiviert mit der Kooperation seines Analogon XLF die Ligase LIG4 und sorgt mit einem Brückenschlag dafür, dass die Ligase LIG4 die DNS Bruchenden erreicht und diese ligiert werden können¹⁷⁷.

¹⁷⁵ Ma et al. 2005.

¹⁷⁶ Grawunder et al. 1997; Sibanda et al. 2001.

¹⁷⁷ Andres et al. 2012; Riballo et al. 2009; Modesti et al. 1999.

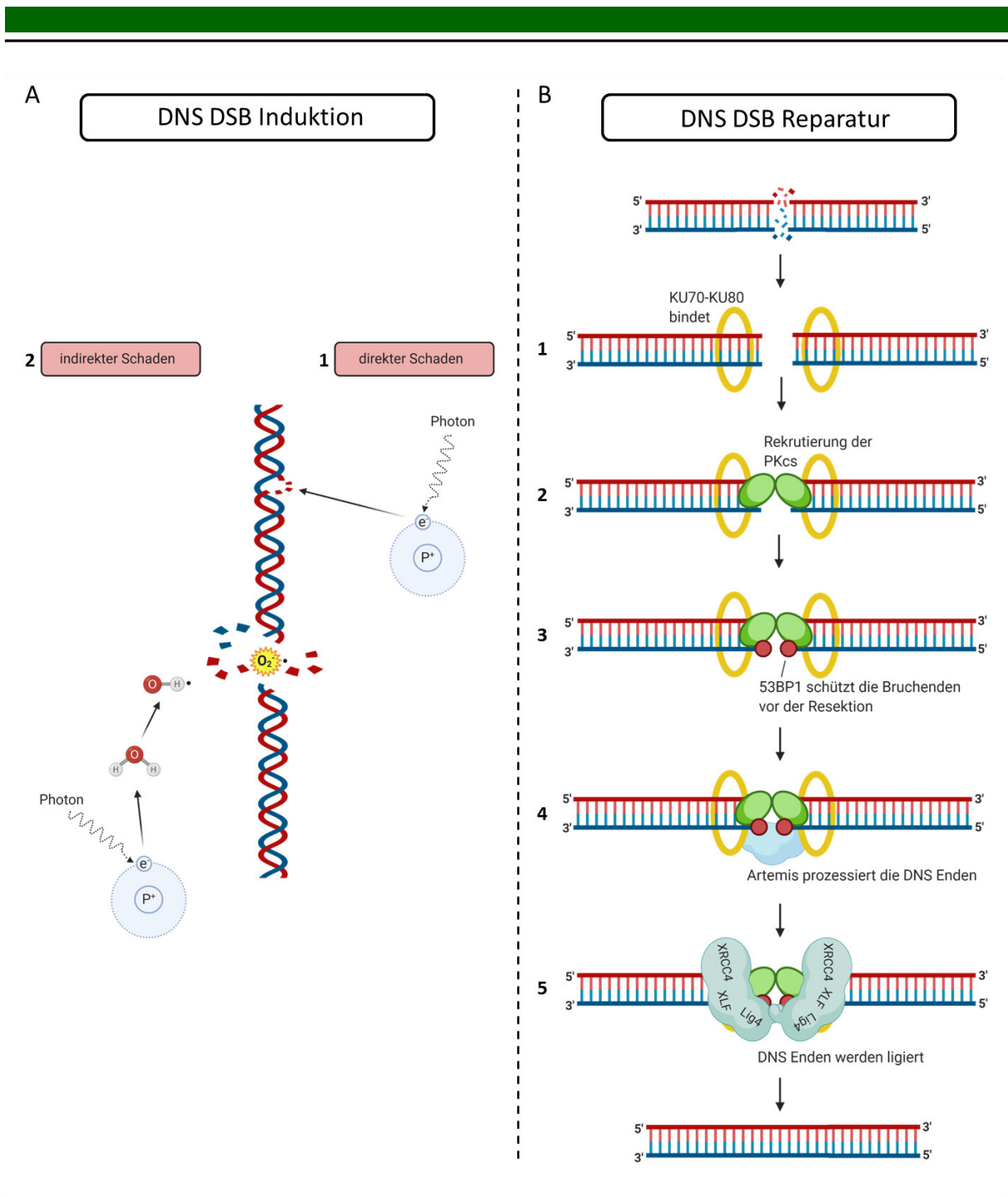


Abbildung 30: DNS DSB-Induktion und -Reparatur über die NHEJ. Erstellt mit BioRender.com.

A: Strahleninduzierte Brüche können entweder direkt (1) durch die Reaktion eines Elektrons, welches durch die Absorption eines Röntgenphotons aus einem Atom herausgeschlagen wurde, oder indirekt (2) über die Radiolyse des Wassers Einzelstrangbrüche in der DNS hervorrufen. Dabei reagiert das herausgelöste Elektron mit Wassermolekülen, wobei sich Hydroxylradikale (OH^\bullet) bilden, die Schäden an der DNS verursachen. Durch die Bildung von Peroxidradikalen (O_2^\bullet) kann im komplementären Doppelstrang ebenfalls ein Bruch erzeugt werden, wodurch ein DNS DSB entsteht. B: Postmitotische Zellen reparieren strahleninduzierte DNS DSBs hauptsächlich über den NHEJ-Weg. Dieser wird durch die Bindung des KU70-KU80 Heterodimers initiiert (1). Die ATM verwandte DNS Proteinkinase (PKcs, engl.: *Protein kinase catalytic subunit*) wird an die Bruchenden rekrutiert (2) und aktiviert die Rekrutierung weiterer Reparaturproteine, wie 53BP1, welches die DNS Enden vor der Resektionsmaschinerie schützt (3). Der Bruchenden-Prozessierungs-Faktor Artemis (4) bereitet die DNS Enden für die Religation durch den XRCC4-XLF-Lig4 Komplex (5) vor.

5.1.2 DNS Doppelstrangbrüche als Regulatoren für die Transkription von Überlebensgenen

DNS Doppelstrangbrüche, die durch ionisierende Strahlung entstehen, sind zufällig gesetzte und komplizierte Schäden an der DNS, welche bei ausbleibender oder fehlerhafter Reparatur zu einer Instabilität des Genoms führen und somit die Bildung von Tumoren und neurodegenerativen Krankheiten begünstigen¹⁷⁸.

DNS Doppelstrangbrüche können ebenso einen physiologischen Ursprung haben und sind in mitotischen Zellen essentiell für die Replikation der DNS oder in B-Zellen für die somatische Rekombination¹⁷⁹. Für postmitotische Zellen konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass bestimmte externe Stimuli zur gezielten Erzeugung von DNS DSBs in Promotorregionen spezifischer Gene führen und auf diese Weise die Transkription dieser Gene ermöglichen. Dieser Mechanismus spielt unter anderem eine Rolle bei der Aktivierung von Serum, Östrogen und Insulin sowie der Ausschüttung von Glucocorticoiden¹⁸⁰. Besonders interessant ist die Erkenntnis, dass neuronale Aktivität in adulten Neuronen zur Induktion von DNS DSBs in Promotorregionen von *immediate early genes* und dadurch zu einer verstärkten Transkription dieser Gene führt¹⁸¹. Neben neuronaler Aktivität kann auch die Zugabe des Neurotransmitters Glutamat als DNS DSB-induzierender Stimulus wirken¹⁸². Glutamat ist der hauptexzitatorische Neurotransmitter im ZNS und essentiell für das Lernen und die Gedächtnisbildung¹⁸³. Die Transkription der *immediate early genes* sorgt für weitreichende Veränderungen im neuronalen Netzwerk, z.B. durch die Anregung des Dendritenwachstums und der Modulierung von Synapsenverbindungen. Die schnelle Transkription von Überlebensgenen dient zur Anpassung an sich verändernde Umgebungssituationen¹⁸⁴.

Die Formation der DNS DSBs wird durch die Topoisomerase II-beta (Top2B) induziert¹⁸⁵. Topoisomerasen sind Enzyme, die die Torsionsbelastung der DNS während der Replikation, Rekombination oder Transkription auflösen, indem sie vorübergehende Brüche in der DNS verursachen¹⁸⁶. Der Bruch ermöglicht DNS Abschnitten in räumliche Nähe zu treten und miteinander zu interagieren. Die meisten dieser Brüche werden von der Top-II β selbst repariert. Allerdings gibt es auch länger anhaltende DNS DSBs, welche über die DNS Schadensantwort repariert werden müssen.

¹⁷⁸ Jackson und Bartek 2009; Rass et al. 2007.

¹⁷⁹ Mehta und Haber 2014; Bouwman und Crosetto 2018.

¹⁸⁰ Bunch et al. 2015; Ju et al. 2006; Trotter et al. 2015; Wong et al. 2009.

¹⁸¹ Lanahan und Worley 1998; Morgan et al. 1987.

¹⁸² Madabhushi et al. 2015; Crowe et al. 2006; Suberbielle et al. 2013.

¹⁸³ Nakanishi 1992; Traynelis et al. 2010; Mattson 2008.

¹⁸⁴ West und Greenberg 2011.

¹⁸⁵ Bunch et al. 2015; Wong et al. 2009.

¹⁸⁶ Wang 2002.

Unter basalen physiologischen Bedingungen, ohne externen Stimulus, interagiert Top2B mit dem Transkriptionsrepressor CTCF (Abb. 31). Dieser verhindert Interaktionen zwischen räumlich weit auseinanderliegenden Chromatinelementen, zu denen unter anderem Enhancer- und Promotorregionen gehören¹⁸⁷. Zusätzlich sorgt die sogenannte RNA-Polymerase-II (RNAPII) Pausierung, welche durch den negativen Transkriptionsfaktor NELF (*engl. negative elongation factor*) verstärkt wird, an Promotorregionen zu einer Unterbindung der Transkription der betroffenen Gene. NELF reguliert außerdem negativ das für die Elongation essentielle Protein DSIF (*engl. DRB sensitivity-inducing factor*)¹⁸⁸. Ein externer Stimulus, wie neuronale Aktivität, führt nun durch die Aktivierung von NMDA Rezeptoren zum Calciumeinstrom in die Zelle. Die nachfolgende Signalkaskade bewirkt die DNS DSB-Induktion durch die Top2B¹⁸⁹. Der DNS DSB führt zur Synthetisierung von eRNA's (*engl. enhancer RNA*) von Enhancerregion der *immediate early genes*. Diese bewirken zusammen mit dem positiven Transkriptionsfaktor pTEFb die Abspaltung von NELF und das Freigeben des DSIF Proteins, wodurch die RNAPII-Pausierung aufgehoben und die RNAPII-gesteuerte Transkription der *immediate early genes* starten kann¹⁹⁰. Zudem erleichtert die synthetisierte eRNA die Genexpression, indem sie durch ihre Interaktion mit dem Cohesin/Mediator-Komplex die Enhancer-Promotor Interaktion stabilisiert.

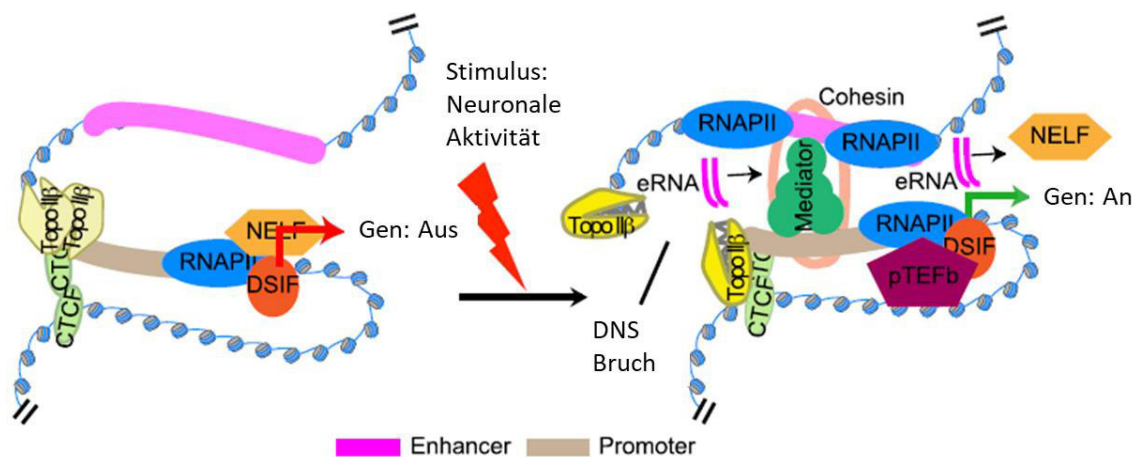


Abbildung 31: Mechanismus der durch neuronale Aktivität induzierten Genregulation.

(Links) Unter Normalbedingungen pausiert RNAPII durch die Aktivität von DSIF und NELF. Zusätzlich sorgt der Transkriptionsrepressor CTCF dafür, dass es zu keiner Interaktion zwischen Promotor und Enhancer kommt. (Rechts) Wird ein Stimulus erzeugt (z.B. neuronale Aktivität) kommt es zum Topo II-beta-medierten DNS Bruch. Dadurch wird die CTCF erzeugte Beschränkung überwunden, sodass Promotor- und Enhancerregion nun miteinander interagieren können. In Neuronen hat das zur Folge, dass eRNAs von Enhancerregionen transkribiert werden, welche wiederum dafür sorgen, dass der negative Elongationsfaktor (NELF) abgespalten wird. Die Aktivierung von pTEFb (Cyclin-abhängige Kinase) löst die RNA

¹⁸⁷ Canela et al. 2017; Uusküla-Reimand et al. 2016.

¹⁸⁸ Wada et al. 1998; Yamaguchi et al. 1999.

¹⁸⁹ Madabhushi et al. 2015; Deisseroth et al. 2003.

¹⁹⁰ Schaukowitch et al. 2014; Zhao et al. 2016.

Polymerasell (RNAPII) von der Promotorregion und veranlasst somit die Geninduktion. Abbildung verändert nach Madabhushi und Kim 2018¹⁹¹.

Immediate early genes (IEGs) besitzen eine große neurologische Relevanz. Sie regulieren neben der Gedächtnisbildung ebenso die homöostatische Plastizität und wirken dadurch neuroprotektiv. So spielt das IEG *Egr1* eine entscheidende Rolle in der Formierung des Langzeitgedächtnisses und in der Bildung von LTPs¹⁹². Ein weiteres IEG welches für die Gedächtnisbildung¹⁹³ und die homöostatische Plastizität¹⁹⁴ unerlässlich ist, ist *Arc*. Ebenso wichtig für die homöostatische Plastizität ist das IEG *Npas4*. Es unterstützt die Aufrechterhaltung der inhibitorischen/ exzitatorischen Balance der neurologischen Synapsen¹⁹⁵.

¹⁹¹ Madabhushi und Kim 2018.

¹⁹² Jones et al. 2001; Bozon et al. 2003.

¹⁹³ Guzowski et al. 2000; Messaoudi et al. 2007; Plath et al. 2006.

¹⁹⁴ Béïque et al. 2011; Gao et al. 2010; Shepherd et al. 2006.

¹⁹⁵ Lin et al. 2008; Zhang et al. 2009.

5.2 Material und Methoden Kap II

5.2.1 Zelllinie J1 NSZ

Die verwendete neuronale Stammzelllinie J1 wurde aus embryonalen Stammzellen von 129/ Ola Mäusen *in vitro* differenziert und immortalisiert¹⁹⁶. Die Verdopplungszeit der Zellen betrug ca. 24 Stunden. Die Differenzierung zu den Reinkulturen aus Neuronen, Astrozyten oder Oligodendrozyten wurde angelehnt an das Differenzierungsprotokoll von Conti und Mitarbeitern¹⁹⁷.

5.2.2 Kultivierung der neuronalen Stammzellen J1

Die neuronalen Stammzellen J1 wurden im Selbsterneuerungsmedium gehalten bis sie eine Konfluenz von ca. 80 % erreicht hatten, erst dann wurden sie im Verhältnis von 1:4 gesplittet. Die adhärent wachsenden Zellen wurden dafür mit Accutase® vom Zellkulturflaschenboden gelöst und in einem ausreichenden Volumen in PBS verdünnt. Für die Stammhaltung wurde ein Viertel dieser Lösung entnommen, anschließend bei 1000 Upm für 3 min. zentrifugiert, das überschüssige PBS abgenommen und das Zellpellet in Selbsterneuerungsmedium aufgenommen und in eine neue Kultivierungsflasche überführt und bei 37 °C inkubiert.

5.2.3 Differenzierungsprotokoll

Die J1 neuronalen Stammzellen wurden entweder in ihrem proliferierendem Zustand gehalten oder durch Veränderung der Kultivierungsbedingungen zu Neuronen, Astrozyten oder Oligodendrozyten differenziert. Zur Einleitung der Differenzierung wurden die neuronalen Stammzellen zuerst von ihrer Zellkulturware durch Accutase® gelöst und für drei Minuten bei 1000 Upm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde im Selbsterneuerungsmedium aufgenommen und die Zellzahl mit einer Neubauer Zählkammer bestimmt. 150.000 Zellen/ cm² für die Differenzierung zu Astrozyten und 200.000 Zellen/ cm² für die Differenzierung zu Oligodendrozyten oder Neuronen wurden auf Laminin und Poly-D-Lysin beschichteter Zellkulturware ausgesät. Nachdem sich die Zellen abgesetzt hatten, wurde das halbe Volumen des Selbsterneuerungsmediums durch das spezifische Differenzierungsmedium ausgetauscht. An den darauffolgenden Tagen wurde das Differenzierungsmedium alle 24 h gewechselt. Experimente erfolgten ab dem Differenzierungstag 9.

¹⁹⁶ Ying und Smith 2003.

¹⁹⁷ Conti et al. 2005.

Tabelle 3: Differenzierungsmedien

Selbsterneuerungs- medium	Astrozytenmedium	Neuronenmedium	Oligodendrozytenmedium
Euromed-N	DMEM	Neurobasalmedium	Neurobasalmedium
1 % L-Glutamin	1 % L-Glutamin	1 % L-Glutamin	1 % L-Glutamin
1 % Pen/ Strep	1 % Pen/ Strep	1 % Pen/ Strep	1 % Pen/ Strep
1 x N2	1 % N2	2 % B27	2 % B27
20 ng/ml EGF	1 % FKS		30 ng/ml T3
20 ng/ml FGF2			

5.2.4 Röntgenbestrahlung

Alle Zellen wurden an einer Röntgenröhre des Typs Titan Isovolt 160 der Firma GE Sensing & Inspection Technologies bestrahlt. Bei einem angelegtem Strom von 19 mA, einer Spannung von 90 kV und einem Abstand von 39 cm zur Strahlungsquelle ergab sich daraus eine Dosisleistung von 0,96 Gy/min. Die Zellen wurden 32 Sekunden lang auf einer 1 mm dicken Aluscheibe bestrahlt um eine Dosis von 500 mGy zu erreichen. Die Eichung der Dosimetrie-Messungen wurde in regelmäßigen Abständen durch einen PTW Weichstrahlkammer-Dosimeter gewährleistet.

5.2.5 Über Nacht Behandlung der Zellen mit unterschiedlichen Agenzien

5.2.5.1 Glutamat und Glyzin

Die hauptexzitatorische Aminosäure im Nervensystem ist Glutamat¹⁹⁸. Es bindet spezifisch an die ionotropen Rezeptoren: NMDAR (N-Methyl-D-Aspartat Rezeptor), AMPAR (*engl. A-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor*) und Kainat-Rezeptor¹⁹⁹. Um eine Aktivierung des NMDA-Rezeptors zu ermöglichen, muss die Aminosäure Glyzin ebenfalls am Rezeptor binden²⁰⁰.

Für die über Nacht Behandlung der Zellen wurden 60 µM Glutamat und 20 µM Glyzin im spezifischen Differenzierungsmedium gelöst und die Hälfte des alten Mediums mit der Agonistenlösung ausgetauscht, um eine möglichst schonende Behandlung der Zellen zu gewährleisten. Effektiv wurden die Zellen somit 14 h lang mit 30 µM Glutamat und 10 µM Glyzin behandelt. Danach wurde das gesamte Medium abgenommen und je nach Versuchsaufbau, frisches Medium mit oder ohne Agenzien wieder dazugegeben.

¹⁹⁸ HAYASHI 1952.

¹⁹⁹ Hollmann et al. 1989.

²⁰⁰ Vyklicky et al. 2014; Karakas und Furukawa 2014.

5.2.5.2 NMDA

NMDA ist ein spezifischer Agonist für NMDA-Rezeptoren. Effektiv wurden die Zellen mit 30 µM oder 50 µM NMDA über Nacht (14 h) behandelt und daraufhin mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert.

5.2.5.3 Glutamatrezeptor – Antagonisten: Ifenprodil

Ifenprodil wirkt als nicht-kompetitiver Antagonist, selektiv an der GluN2B Untereinheit des NMDA-Rezeptors²⁰¹. Über Nacht wurden die Zellen mit 25 µM Ifenprodil, in Anwesenheit von 30 µM Glu (Glutamat) und 10 µM Gly (Glyzin), behandelt und daraufhin mit 4 % PFA fixiert.

5.2.5.4 MK-801

Dizocilpine, häufig auch als MK-801 bezeichnet, wirkt als Kanalblocker in allen NMDA Rezeptoren²⁰². Je nach Versuchsaufbau wurden die Zellen zuerst über Nacht mit 10 µM MK-801 und 30 µM Glu und 10 µM Gly behandelt und danach entweder direkt fixiert oder das alte Medium durch frisches Medium mit oder ohne Agenzien ersetzt.

5.2.5.5 Merbarone

Merbarone (*engl. 5-[N-phenyl carboxamido]-2-thiobarbituric acid*) ist ein Medikament zur Behandlung von bösartigen Tumoren. Es inhibiert die katalytische Aktivität der DNS Topoisomerase II-beta, ohne die DNS zu beschädigen²⁰³. Die Zellen wurden mit 10 µM Merbarone 14 h behandelt und daraufhin mit PFA fixiert.

5.2.6 Apoptose-Assay

Für das Apoptose Assay wurden die Zellen in IBIDI® Zellkulturware (Abb. 32) ausgesät und je nach Zelltyp 10 Tage lang differenziert oder im Falle der neuronalen Stammzellen, einen Tag vor Bestrahlung bzw. Behandlung (Glu/ Gly), ausgesät. Die Zellen wurden nach der Bestrahlung (500 mGy), zu den Zeitpunkten 4 h, 6 h und 8 h fixiert und das Protein *caspase 3* in seiner *cleaved* Form durch Antikörperfärbung nachgewiesen, um festzustellen ob der Zelltod eingeleitet worden ist²⁰⁴. Die Auswertung erfolgte halbautomatisch mit einem Axio Observer Z1 Fluoreszenzmikroskop (Zeiss). Für jeden Zeitpunkt wurden 200 Zellen ausgezählt.

²⁰¹ Reynolds und Miller 1989.

²⁰² Huettner und Bean 1988; Wong et al. 1986.

²⁰³ Khelifa und Beck 1999; Glover et al. 1987; Drake et al. 1989..

²⁰⁴ Lazebnik et al. 1994.

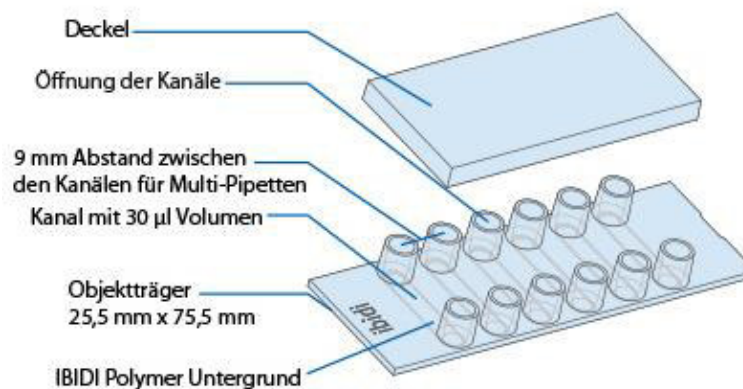


Abbildung 32: Schematische Darstellung der IBIDI® Zellkulturware µ-Slide VI 0.4.

Abbildung verändert aus ibidi.com/channel-slides/57--slide-vi-04.html.

5.2.7 MTT-Assay

Das MTT Assay wurde durchgeführt um die metabolische Aktivität der Zellen zu bestimmen. Die Funktionsweise des Assays beruht auf der Reduktion des gelben Farbstoffes 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in ein violette Formazan durch die Glykolyse lebendiger Zellen.

Für das MTT Assay wurden je 60.000 J1 Stammzellen pro well in einer Laminin/ Poly-D-Lysin beschichteten 96-well Platte ausgesät und mindestens 12 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach neun bzw. zehn Differenzierungstagen wurde pro well 10 µl MTT-Reagenz (5 mg/ ml) hinzugegeben und die Zellen für 75 min. bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Das überschüssige Medium wurde abgenommen und die wasserunlöslichen Formazankristalle, die sich am Boden der wells gebildet hatten, mit einer Isopropanol/ 0,04N HCl-Lösung dissoziiert. Daraufhin wurde die Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 570 nm am Plattenlesegerät (Synergy™ HTX Multi-Mode Microplate Reader) der Firma BioTek™ gemessen, wobei eine Messung bei einer OD von 630 nm dabei als Referenz diente. Für jede Bedingung wurden je 24 wells ausgewertet.

5.2.8 Antikörperfärbung

Antikörperfärbungen wurden durchgeführt nachdem die Zellen 20 min. mit einer 4 %igen PFA-Lösung fixiert und anschließend mit einer Lösung aus PBS (*engl. phosphate buffered saline*) und 0,1 % Triton X-100 permeabilisiert wurden. Bei diesem Schritt wurde Hoechst33342 1:100 eingesetzt um den Zellkern zu färben. Anschließend wurden die freien Proteinenden über Nacht bei 4 °C, durch eine Lösung aus PBG (0,05 % Gelatine in PBS), 0,5 % BSA und 5% igen Ziegen Serum, geblockt. Anschließend wurde der jeweilige primäre Antikörper in entsprechender Konzentration (Tabelle 4), in Antikörperpuffer (5 % Ziegen Serum in PBG) gelöst und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach

dreimaligem Waschen mit PBG erfolgte anschließend die sekundäre Antikörperfärbung bei Raumtemperatur für 45 min., der sekundäre Antikörper wurde dabei 1:400 in Antikörperpuffer gelöst (Tabelle 5). Darauf folgten je zwei Waschschritte à 10 min. mit PBG und PBS.

Tabelle 4: Liste der verwendeten primären Antikörper

prim. Antikörper		Wirt	Firma	Marker für:	Konzentration
53BP1	<i>P53-interacting protein</i>	Hase	Santa-Cruz	DNS-Doppelstrangbrüche	1:1500
AMPA	<i>AMPA</i>	Hase	Alomone	AMPA Rezeptor	1:500
c-cas 3	<i>cleaved caspase 3</i>	Hase	Cell Signaling	Apoptose	1:500
CD1	<i>Cyclin D1</i>	Maus	Santa Cruz	G1-Phase	1:300
GABA B3	<i>GABA beta 3</i>	Maus	Thermo Fisher	GABAR UE	1:100
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>	Hase	Abcam	Astrozyten	1:200
KI67	<i>KI67</i>	Hase	Abcam	Proliferation	1:100
MAP-2	<i>Microtubuli-associated protein 2</i>	Hase	Chemicon	Neurone	1:200
MBP	<i>myelin basic protein</i>	Hase	Abcam	Oligodendrozyten	1:300
Nestin	<i>Nestin</i>	Maus	Abcam	Stammzellen	1:200
NR1	<i>NMDAR 1</i>	Hase	Santa Cruz	NMDAR UE	1:100
NR2A	<i>NMDAR 2A</i>	Hase	Alomone	NMDAR UE	1:200
NR2B	<i>NMDAR 2B</i>	Hase	Abcam	NMDAR UE	1:250
Olig2	<i>Oligodendrocyte transcription factor 2</i>	Maus	Merck	Oligodendrozyten	1:300
PSD95	<i>Postsynaptic density protein 95</i>	Hase	Abcam	Synapsen	1:200
Synaptophysin	<i>Major synaptic vesicle protein p38</i>	Maus	Abcam	Synapsen	1:200
yH2AX	<i>Gamma-H2AX</i>	Maus	Millipore	DNS-Doppelstrangbrüche	1:1000
β III Tubulin	<i>beta III Tubulin</i>	Maus	Abcam	Neurone	1:200

Tabelle 5: Liste der verwendeten sekundären Antikörper

sek. AK	Spezifität	Wirt	Firma	Absorptionsmax.	Emissionsmax.	Konzentration
Alexa 488	Maus	Ziege	Abcam	496	519	1:400
Alexa 594	Hase	Esel	Abcam	590	617	1:400
Alexa 488	Hase	Ziege	Abcam	496	519	1:400
Alexa 594	Maus	Ziege	Abcam	590	617	1:400

5.2.9 Mikroskopie

Alle Immunfluoreszenzfärbungen wurden entweder mit dem Axio Observer Z1 Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) oder dem TCS SP5 Konfokalmikroskop (Leica) aufgenommen und ausgewertet. Durchlicht-Mikroskopieaufnahmen wurden mit dem JuLi® FL Mikroskop der Firma Nano EnTek getätigt.

5.2.10 Mikroelektrodenarray (MEA)

Das Mikroelektrodenarray ermöglichte eine extrazelluläre Ableitung der Spannungsänderung von *in vitro* kultivierten Neuronen. Das in dieser Arbeit verwendete Mikroelektrodenarray des Typs MEA2100-System stammte von der Firma Multi Channel Systems MCS GmbH und war die bis dato neueste Entwicklung der Produktfamilie (Abb. 33).



Abbildung 33: Aufbau des MEA2100-Systems der Firma Multi Channel Systems MCS GmbH.

Das MEA2100-System bestand aus zwei Hauptkomponenten, der Headstage und dem Interface Board. Die Headstage, mit verbundenem Interface ermöglichte eine direkte Verarbeitung der aufgenommenen Daten, so verstärkte die Headstage das Signal und wandelte die analogen Eingangssignale in digitale Daten um, während über das Interface Board die Bandbreite der Filter, die Abtastfrequenz und der Bereich der Signale eingestellt wurden (MEA2100-System Manual; multichannelsystems.com).

Die eingesetzten MEA-Chips waren vom Typ 60MEA200/10iR-Ti (Abb. 34). Das bedeutet die Chips bestanden aus 60 Elektroden, wobei jede Elektrode einen Durchmesser von 10 µm hatte und in

einem Abstand von 200 μm zur benachbarten Elektrode stand. Die Kontaktflächen auf denen die Elektroden platziert und die Spuren die von den Elektroden wegführten bestanden aus Titanitrit. Diese Oberflächenvergrößerung ermöglichte eine Impedanz- Verkleinerung der Elektroden. Eine interne Referenzelektrode ermöglichte zudem die direkte Erdung des Systems (MEA-Manual; multichannelsystems.com).

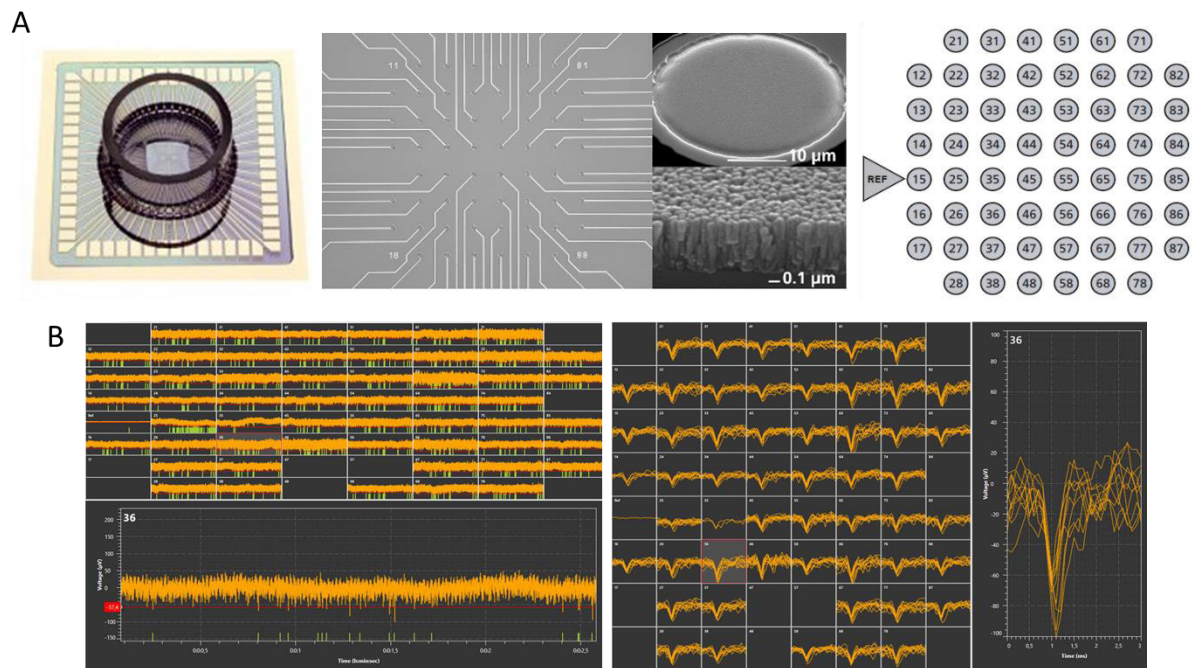


Abbildung 34: MEA-Chip und -Software.

(A) Aufbau des 60MEA200/10iR-Ti Chips. Die 59 Elektroden plus eine Referenzelektrode besaßen einen Durchmesser von 10 μm und waren hexagonal angeordnet. (B) Beispielmessung eines MEA-Chips von differenzierten Neuronen. Links die gemessenen Timestamps (Spikes), rechts die aufgenommenen Waveforms (Amplituden) aller Elektroden bzw. in Vergrößerung der Elektrode 36.

Um eine hydrophile Oberfläche zu gewährleisten wurden die MEA-Chips zuerst mit Sauerstoffplasma beschichtet. Dies geschah am Plasmaofen des Typs Zepto LF der Firma Diener electronic GmbH & Co KG, bei 0,3 mbar für 100 s. Kurz vor der Kultivierung der Zellen erfolgte zusätzlich eine Beschichtung mit Laminin und Poly-D-Lysin im Verhältnis von 1:1. Danach wurden je 500.000 neuronale Stammzellen in ihrem Selbsterneuerungsmedium auf je einem MEA-Chip ausgesät. Nach mindestens 12-stündiger Inkubations- und Ruhezeit, wurde die Differenzierung zu Neuronen eingeleitet, indem die Hälfte des Selbsterneuerungsmediums mit Neuronenmedium ausgetauscht wurde. Neun Tage nach dem Start der Differenzierung wurden alle Chips zum ersten Mal am MEA-System gemessen. Dafür wurde das Medium eine halbe Stunde vor der Messung gewechselt. Eine Messung lief 100 Sekunden lang, während dieser Zeit wurde der MEA-Chip kontinuierlich auf einer Temperatur von 37 $^{\circ}\text{C}$ gehalten. Am Abend des neunten Differenzierungstages wurden die Chips in drei verschiedene Behandlungsgruppen eingeteilt, Glu/ Gly + 500 mGy, 500 mGy und Kontrolle. Glu/ Gly +

500 mGy Chips wurden am neunten Tag mit Glutamat und Glyzin über Nacht behandelt, am darauffolgenden Tag wurde das Medium ohne Agonisten gewechselt und wie unter Kapitel 5.2.4 beschrieben, bestrahlt. Chips der Behandlungsgruppen 500 mGy und Kontrolle wurde am zehnten Tag das Medium gewechselt und entweder mit 500 mGy oder sham bestrahlt. Am elften und dreizehnten Differenzierungstag wurden weitere MEA-Messungen aufgenommen. Alle Ereignisse die eine größere Spannung als die vierfache Standardabweichung des Rauschens aufwiesen wurden als *Timestamps* (Spikes) gewertet. Ebenso wurden nur Ereignisse ausgewertet, die eine größere Amplitude als 20 μ V aufwiesen. Die Größe der Amplitude wurde durch die Bestimmung der *Waveforms* ermittelt (Abb. 34 B).

5.2.11 Auswertung

Die Auswertung der Immunfluoreszenzbilder erfolgte mit den Softwareprogrammen FIJI und GraphPad Prism Version 7. Kalkulationen und statistische Auswertungen erfolgten mit GraphPad Prism und Excel. Die Auswertung der MEA Daten erfolgte mit der Software NeuroExplorer®.

5.3 Ergebnisse Kap II

5.3.1 Differenzierung des *in vitro* Modellsystems J1 NSZ zu homogenen Deszendendentenkulturen

Um einen Eindruck von der Strahlungssensitivität des Nervensystems gegenüber Niedrigdosisstrahlung zu bekommen stellt die Komplexität eines neuronalen Netzwerks die größte Herausforderung dar. Ein bereits etabliertes murines *in vitro* Zellsystem, die neuronale Stammzelllinie J1, eignet sich dabei durch seine Minimalistik besonders gut um einzelne Zelltypen zu separieren und genauer zu betrachten. In vorangegangenen Arbeiten konnten die neuronalen Stammzellen erfolgreich in ein rudimentäres, funktionales, neuronales Netzwerk aufgebaut aus Neuronen und Astrozyten differenziert werden (Dr. Kerstin Rau²⁰⁵). In der vorliegenden Arbeit sollte das Differenzierungsprotokoll leicht abgeändert werden, um die Effekte von Niedrigdosisstrahlung auf jeden einzelnen Zelltyp individuell untersuchen zu können und mögliche Unterschiede in der Strahlensensitivität aufzudecken. Die multipotente neuronale Stammzelllinie (NSZ) J1 wurde so in ihre drei möglichen Deszendenten, Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten, als einzelne Kulturen differenziert.

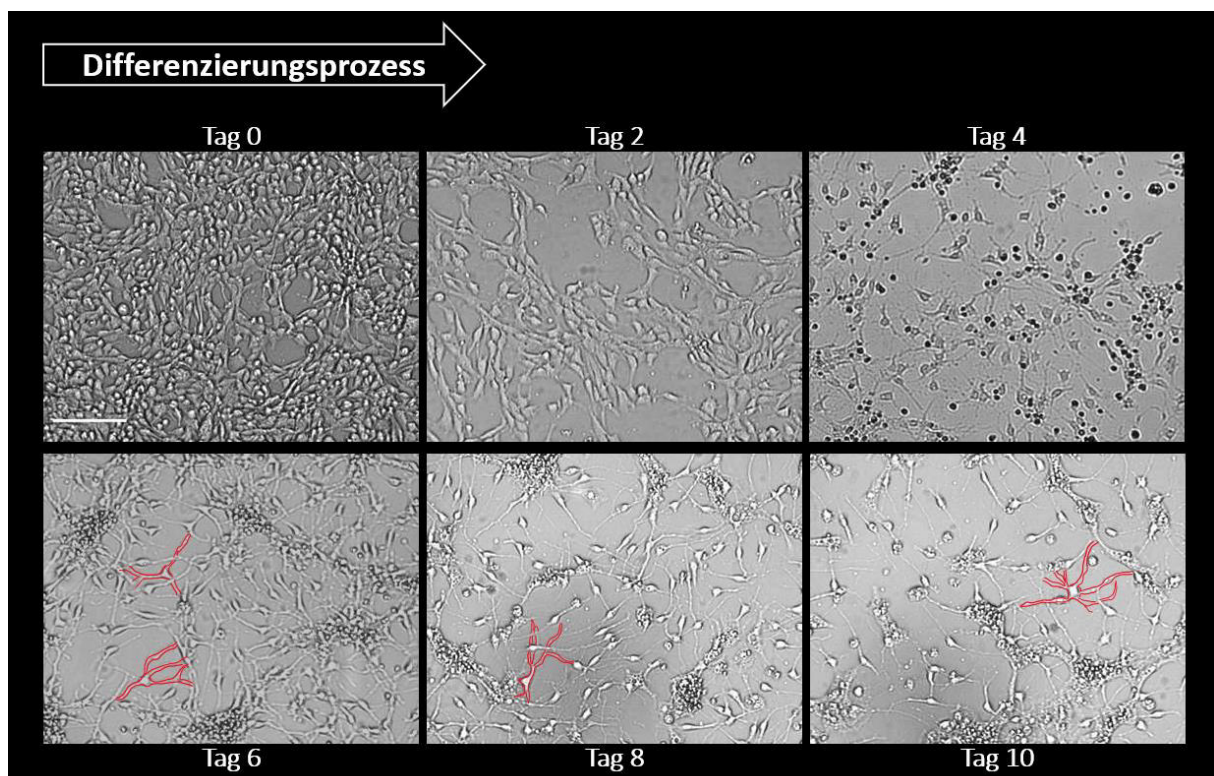


Abbildung 35: Morphologische Veränderungen während des Differenzierungsprozesses von neuronalen Stammzellen zu Neuronen.

²⁰⁵ Kerstin Rau 2018.

Neuronale Stammzellen (NSZ) wurden über einen Zeitraum von 10 Tagen durch spezifische Veränderung der Kultivierungsbedingungen zu Neuronen differenziert. Zu Differenzierungsbeginn und daraufhin alle zwei Tage, wurden Bilder mit dem Durchlichtmikroskop JuLI™ angefertigt. Der Maßstabsbalken beträgt 50 µm.

In jeder neuronalen Stammzelle der J1 Zelllinie liegt das Potenzial sich in drei verschiedene Deszendenten zu differenzieren. Durch gezielt eingesetzte Wachstumsfaktoren können die Zellen in eine bestimmte Differenzierungsrichtung konzentriert werden, so wie in den Abbildungen 35, 36 und 37 dargestellt. Die Differenzierung ist ein hochdynamischer Prozess, bei dem die Zellen sich morphologisch zunehmend verändern und ebenso eine stetige Migration und Bewegung stattfindet, die letztendlich zur Bildung eines Netzwerkes führt²⁰⁶. So verdichtete sich über die Zeit (Tag 4) der Zellkörper der differenzierenden Neurone und die Zellfortsätze begannen zu expandieren und sich mit ihrer Umgebung zu verbinden. Diese Zellfortsätze wurden zunehmend komplexer und filigraner, bis sie an Tag 10 ein flächendeckendes Netzwerk bildeten (Abb. 35). Neben den Neuronen war es ebenso mögliche Gliakulturen aus den NSZ zu generieren.

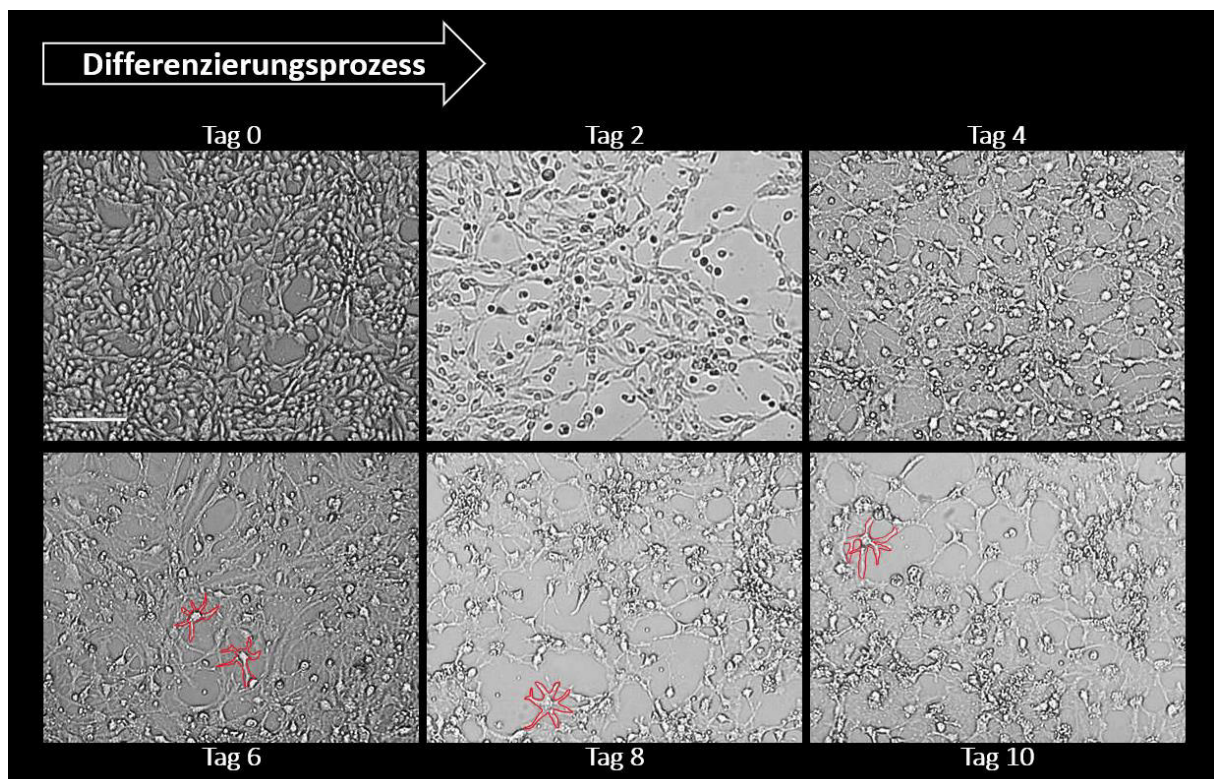


Abbildung 36: Morphologische Veränderungen während des Differenzierungsprozesses von neuronalen Stammzellen zu Astrozyten.

Neuronale Stammzellen wurden über 10 Tage durch die Zugabe von spezifischen Wachstumsfaktoren gezielt zu einer homogenen Astrozytenkultur differenziert. Dokumentiert wurde die Differenzierung alle zwei Tage mit einem Durchlichtmikroskop. Der Maßstabsbalken beträgt 50 µm.

Die Astrozyten sind, *in vivo*, für ein funktionierendes neuronales Netzwerk ebenso essentiell wie Neurone. Sie tragen nicht nur die Rolle der Stützfunktion sondern modulieren aktiv ihre, und somit

²⁰⁶ Kuijpers und Hoogenraad 2011; Marín et al. 2010; Kapitein und Hoogenraad 2015.

die gesamte neuronale Umgebung. So nehmen sie überschüssiges Kalium, welches sich insbesondere bei hoher Aktivität von Neuronen im extrazellulären Raum ansammelt, über den Kalium-Kanal $K_{ir}4.1$ auf, und verhindern somit eine unkontrollierte Depolarisation von benachbarten Neuronen²⁰⁷. Doch nicht nur Kalium muss aus dem extrazellulären Raum entfernt werden, besonders der exzitatorische Neurotransmitter Glutamat kann in hohen Konzentrationen zu einer Übererregung, bis hin zur Exzitotoxizität, in Neuronen führen²⁰⁸. Astrozyten nehmen Glutamat über die sogenannten GLT-1 und GLAST-Transporter auf, welche sich in unmittelbarer Nähe von Synapsen befinden. 80 % des über Synapsen freigesetzten Glutamates wird so von den Astrozyten aufgenommen²⁰⁹. Das Glutamat wird in den Astrozyten durch die Glutaminsynthetase in Glutamin umgewandelt und wieder in den extrazellulären Raum abgegeben. Von dort aus kann das Glutamin wieder von benachbarten Neuronen aufgenommen und durch die Glutaminase wieder in Glutamat umgewandelt werden. Dies geschieht sowohl in glutamatergen als auch in GABAergen Synapsen, da Glutamat als Vorläufer des Neurotransmitters GABA dient²¹⁰. Morphologisch bildeten die Astrozyten sternenförmige, große Zellkörper aus, die sich zu einer wabenartigen Netzstruktur zusammenfinden (Abb. 36).

Die multipotenten neuronalen Stammzellen waren zudem in der Lage eine weitere Art von Gliazellen hervorzubringen, die Oligodendrozyten. Diese Gliazellen sorgen durch ihre myelinisierten Fortsätze für eine schnelle Signalweiterleitung zwischen den Neuronen²¹¹. Während der Differenzierung verkleinerte sich der Zellkörper und bildete gleichzeitig eine Vielzahl an Zellfortsätzen aus. Ab dem sechsten Differenzierungstag wiesen die differenzierten Zellen mit ihren verästelten Zellfortsätzen die typische baumartige Morphologie von Oligodendrozyten auf (Abb. 37).

²⁰⁷ Kuffler 1967; Djukic et al. 2007; Sibille et al. 2014; Larsen et al. 2014.

²⁰⁸ Rothman 1984; Gillessen et al. 2002; Nakanishi 1992; Zhou und Danbolt 2014.

²⁰⁹ López-Bayghen und Ortega 2011.

²¹⁰ Uwechue et al. 2012; Tani et al. 2014; Liang et al. 2006.

²¹¹ Nave 2010; Jahn et al. 2009; Aggarwal et al. 2011.

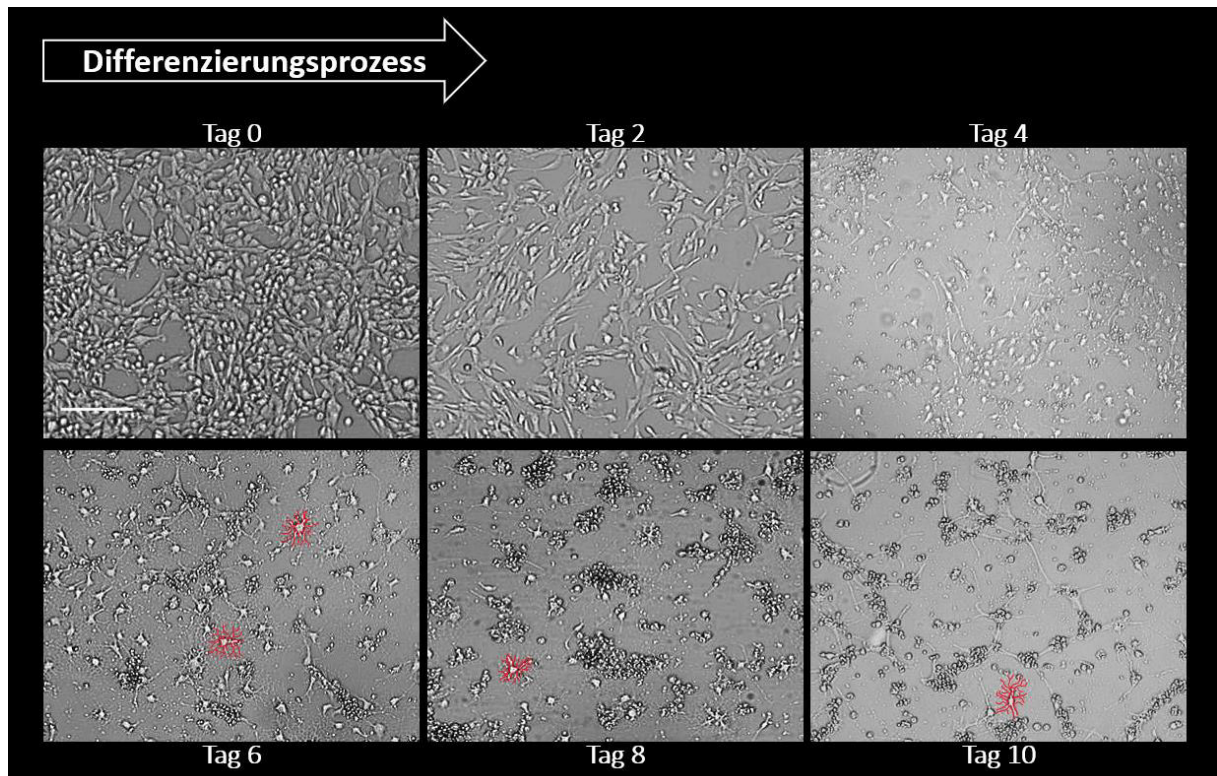


Abbildung 37: Morphologische Veränderungen während des Differenzierungsprozesses von neuronalen Stammzellen zu Oligodendrozyten.

Neuronale Stammzellen (NSZ) wurden über einen Zeitraum von 10 Tagen durch spezifische Veränderung der Kultivierungsbedingungen zu Oligodendrozyten differenziert. Zu Differenzierungsbeginn und daraufhin alle zwei Tage, wurden Bilder mit dem Durchlichtmikroskop JuLI™ angefertigt. Der Maßstabsbalken beträgt 50 µm.

Nachdem die neuronalen Stammzellen erfolgreich zu Kulturen aus Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten differenziert wurden, sollte nun überprüft werden ob diese Zellen auch alle Stammzellcharakteristika verloren hatten und stattdessen Marker adulter neuronaler Zellen exprimierten. Typische Stammzellcharakteristika sind unter anderem, die Fähigkeit zur symmetrischen Teilung, sowie die Expression des Intermediärfilament-Proteins, Nestin²¹². Mitotisch aktive Zellen lassen sich durch die Anwesenheit des KI-67 Proteins nachweisen, welches in der G(0) Phase von ruhenden Zellen nicht vorhanden ist²¹³. Zusätzlich wurden die charakteristischen Strukturproteine der adulten Deszendenten nachgewiesen.

²¹² Hockfield und McKay 1985; Lendahl et al. 1990.

²¹³ Gerdes et al. 1984; Gerdes et al. 1991; Dowsett et al. 2011.

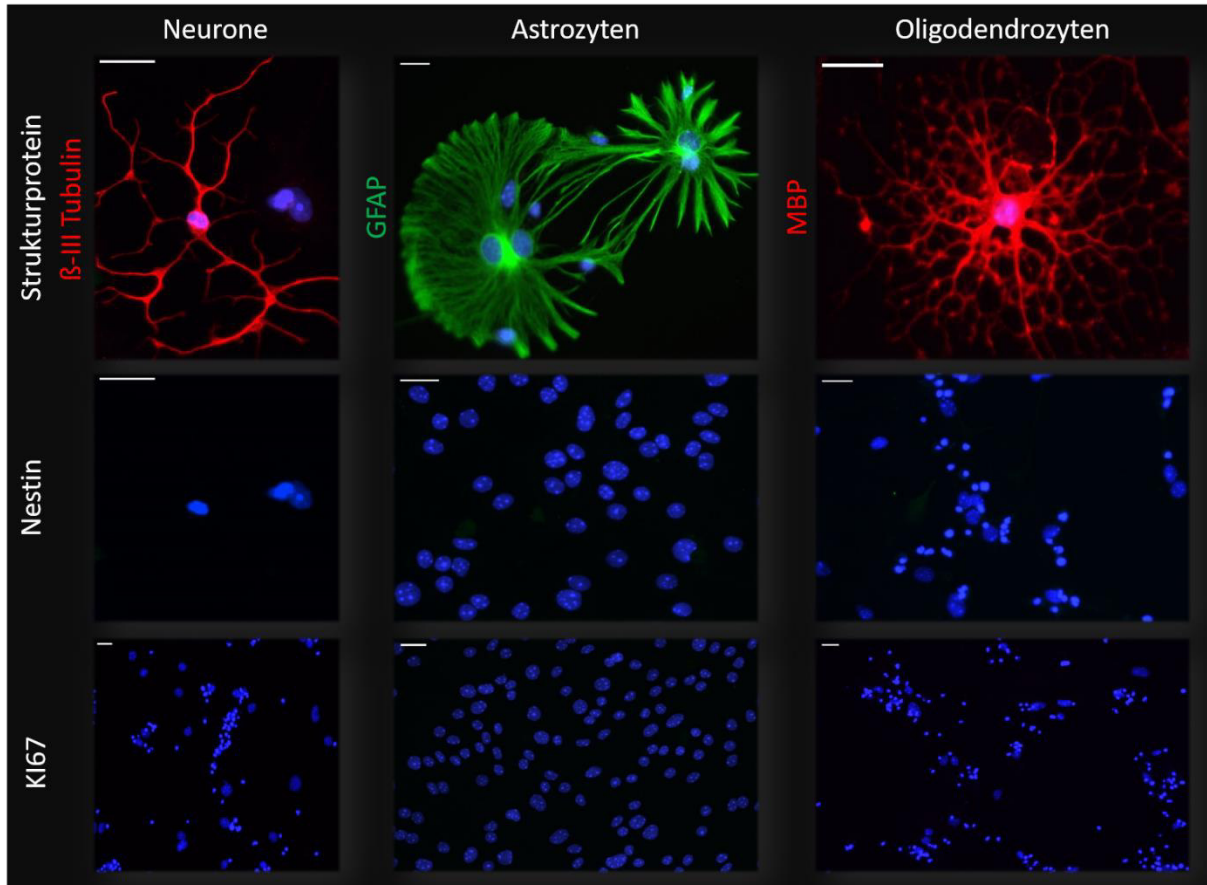


Abbildung 38: Deszendentenkulturen verloren Stammzellcharakter und exprimierten strukturspezifische Proteine.

In den Neuronen wurde das charakteristische Strukturprotein β -III Tubulin, in den Astrozyten GFAP (engl. *glial fibrillary acidic protein*) und in den Oligodendrozyten MBP (engl. *myelin basic protein*) durch Immunfluoreszenzfärbungen nachgewiesen. In allen drei Deszendenten konnte weder der charakteristische Stammzellmarker Nestin, noch der Proliferationsmarker KI-67 nachgewiesen werden. Die Größe der Maßstabsbalken beträgt 25 μ m.

Abbildung 38 zeigt die Immunfluoreszenzfärbungen der drei Deszendenten nach 10-tägiger Differenzierung. Bei allen konnte das für sie maßgebende Intermediärfilament nachgewiesen werden. Für die Neuronen bedeutete es, dass sie β -III Tubulin²¹⁴, für die Astrozyten, dass sie das saure Gliafaserprotein (GFAP)²¹⁵ und für die Oligodendrozyten, dass sie MBP (engl. *myelin basic protein*) exprimierten²¹⁶. Darüber hinaus konnte in keiner der drei Zelldifferenzierungen das stammzelltypische Intermediärfilament Nestin fluoreszenz-markiert werden, was wiederum bedeutete, dass die Deszendenten ihren Stammzellcharakter verloren hatten. Ebenso konnte das Proliferationsprotein KI-67 weder in der Neuronenkultur, noch in den Gliakulturen nachgewiesen werden, sodass geschlussfolgert werden konnte, dass sich alle Zellen im postmitotischen Zustand

²¹⁴ Sullivan und Cleveland 1986; Lee et al. 1990; Leandro-García et al. 2010.

²¹⁵ Freeman 2010; Fu et al. 2009.

²¹⁶ Pedraza et al. 1997; Campagnoni et al. 1980; Kalwy und Smith 1994.

befanden. Aufgrund der Expressionsmuster konnte davon ausgegangen werden, dass alle Kulturen nach 10 Tagen Differenzierung ihren Stammzellcharakter verloren hatten und nicht nur morphologisch, sondern auch auf Proteinebene den adulten Status erreicht hatten. Die Homogenität der einzelnen Deszendents-Kulturen wurde zusätzlich im Folgenden quantitativ überprüft (Abb. 39).

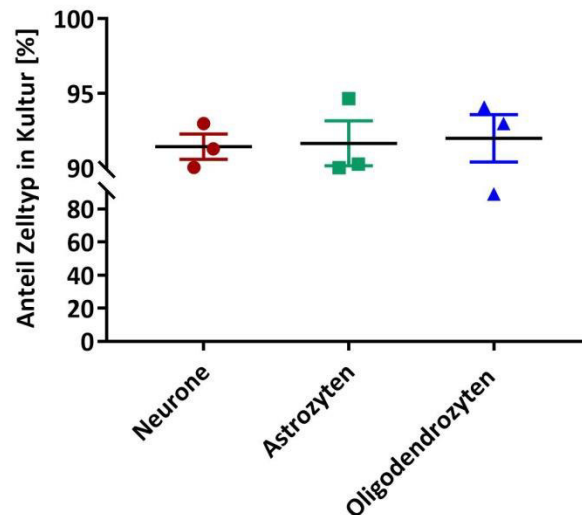


Abbildung 39: Gerichtete Differenzierung führte zu homogenen Deszendentskulturen.

Für die Quantifizierung wurden die Kulturen mit den für sie spezifischen adulten Struktur- bzw. Transkriptionsproteinen per Immunfluoreszenzfärbung markiert und semi-automatisch Fotos aufgenommen, welche über die Software ImageJ ausgewertet wurden. Für die Neurone wurde der Marker MAP2 (engl. *microtubule-associated protein 2*), für die Astrozyten GFAP (engl. *glial fibrillary acidic protein*) und für die Oligodendrozyten Olig2 (engl. *oligodendrocyte transcription factor 2*) eingesetzt. Dargestellt ist der Mittelwert mit SEM aus $n = 3$ unabhängigen Experimenten mit je >200 Zellen/Kulturbedingung/ Experiment.

Die Quantifizierung der Deszedenten-Kulturen erfolgte nach 10-tägiger Differenzierung. Dabei wurde in der Neuronenkultur das charakteristische Strukturprotein MAP2 (engl. *microtubule-associated protein 2*)²¹⁷, in der Astrozytenkultur das Intermediärfilament GFAP und in der Oligodendrozytenkultur der Transkriptionsfaktor Olig2 (engl. *oligodendrocyte transcription factor 2*)²¹⁸ nachgewiesen. Im Schnitt waren 91,43 % der Zellen in der Neuronenkultur MAP2 positiv, 91,65 % der Zellen in der Astrozytenkultur GFAP positiv und 91,99 % der Zellen in der Oligodendrozytenkultur Olig2 positiv.

Für die Analyse strahleninduzierter Effekte war die Zusammensetzung der Art der Neuronen von besonderer Bedeutung. Um exzitatorische Neurone kenntlich zu machen wurden Immunfluoreszenzfärbungen gegen die NMDAR Untereinheit NR1 und den AMPA Rezeptor

²¹⁷ Izant und McIntosh 1980; Harada et al. 2002; Kalcheva et al. 1998.

²¹⁸ Zhou et al. 2000; Liu et al. 2007; Maire et al. 2010.

angefertigt²¹⁹. Inhibitorische Neurone konnten durch die Markierung gegen die β 3-UE des GABA Rezeptors nachgewiesen werden²²⁰. Zusätzlich wurden die Proteine PSD95 (*engl. post synaptic density protein 95*) und Synaptophysin markiert. PSD95 wird exklusiv von Neuronen exprimiert und befindet sich zumeist in der postsynaptischen Dichte, dort dient es als Bindungspartner für NMDA- und AMPA-Rezeptoren und spielt wiederum in der synaptischen Plastizität eine tragende Rolle. Synaptophysin ist ein synaptisches Vesikel-Glykoprotein welches in allen Neuronen vorkommt die synaptische Transmissions-Aktivitäten aufweisen²²¹.

Die deutlichen Markierungen der NMDA- und AMPA-Rezeptoren ließen darauf schließen, dass sich hauptsächlich exzitatorische Neurone in der Deszendentenkultur befanden. Die beiden Proteine PSD95 und Synaptophysin, welche essentiell für die synaptische Signalübertragung sind, konnten ebenfalls nachgewiesen werden (Abb. 40). Die Neuronenkultur bestand aus einer Mischung aus exzitatorischen und inhibitorischen Neuronen welche im Zusammenspiel mit den Signalproteinen höchstwahrscheinlich ein erregbares Netzwerk bildeten, welches auf äußere Signale sensitiv reagieren konnte.

²¹⁹ Cotman et al. 1988; Collingridge und Singer 1990.

²²⁰ Sigel und Steinmann 2012.

²²¹ Thiel 1993; Mardones et al. 2019.

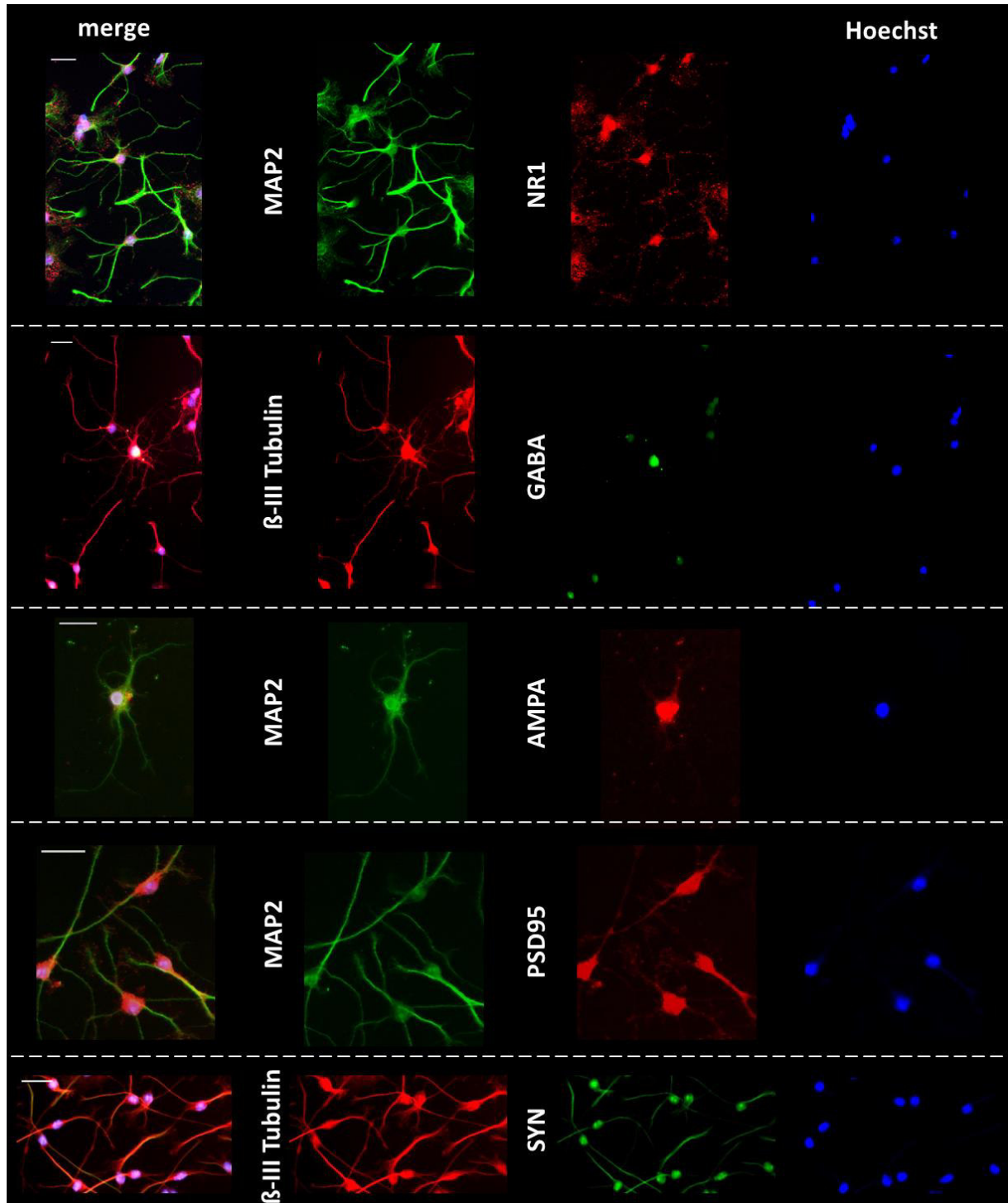


Abbildung 40: Immunfluoreszenzbestimmung der Neuronenarten in ausdifferenzierten Neuronenkulturen.

Markiert wurde die NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors (rot) und das Strukturprotein MAP2 (grün) um exzitatorische Neurone nachzuweisen. Die beta3-UE des GABA Rezeptors (grün) und das Markerprotein β -III Tubulin (rot) weisen inhibitorische Neurone aus. AMPA-Rezeptoren und das synaptische Protein PSD95 wurden in Rot markiert, als Referenz das Neuronen charakteristische Strukturprotein MAP2 in Grün. Das Glykoprotein Synaptophysin (SYN) ist in Grün, β -III Tubulin in Rot dargestellt. In allen Färbungen ist der Zellkern durch Hoechst33342 in Blau kenntlich gemacht, die zusammengefügt Bilder werden unter merge auf der linken Seite dargestellt. Die Größe der Maßstäbe beträgt 25 μ m.

Nach 10 Tagen Differenzierung konnten aus der Stammzelllinie J1 erfolgreich drei unterschiedliche Zellkulturen generiert werden. Diese Zellkulturen hatten ihren Stammzellcharakter verloren, das bedeutet sie exprimierten weder das stammzelltypische Strukturprotein Nestin, noch waren sie mitotisch. Die erfolgreiche Differenzierung konnte morphologisch verfolgt und durch den Immunfluoreszenznachweis der spezifischen Intermediärfilamente verifiziert werden. Durch die Quantifizierung der Charakteristika der Deszendenten konnte für alle drei Zellkulturen eine Homogenität von über 91 % ausgemacht werden, sodass nun im Folgenden neuronale Stammzellen, Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten unabhängig voneinander untersucht werden konnten.

5.3.2 Bestimmung eines Reparaturproteins zur Markierung von DNS DSBs

Die folgereichsten Schäden die durch ionisierende Strahlung in der Zelle auftreten können, sind Doppelstrangbrüche (DSBs) in der DNS²²². Einige Reparaturproteine der Zelle dienen hierbei seit Jahrzehnten als zuverlässige Marker eines solchen DSBs. Wobei insbesondere die Reparaturproteine γ H2AX (phosphoryliertes Histon H2AX) und 53BP1 (*engl.: p53-binding protein*) am meisten Verwendung finden²²³. Aufgrund der lokalen Aggregation dieser Proteine in der Nähe eines DSBs, können diese als Foci, fluoreszenzmarkiert, sichtbar gemacht werden. Die Strahlensensitivität von neuronalen Stammzellen sowie deren Deszendenten ist weitestgehend von den möglichen Reparaturmechanismen, sowie ihrer spezifischen Radikalpufferkapazität abhängig. Im folgenden Abschnitt sollte mittels dieser Reparaturproteine eine genauere Beurteilung der individuellen Strahlensensitivität von Neuronen und Astrozyten erfolgen. Ausgewertet wurde die Akkumulation und Dissoziation der Reparaturproteinen γ H2AX und 53BP1 an bzw. von strahleninduzierten DNS DSBs.

²²² Goodhead 1994.

²²³ Anderson et al. 2001; Sak und Stuschke 2010; Rogakou et al. 1999.

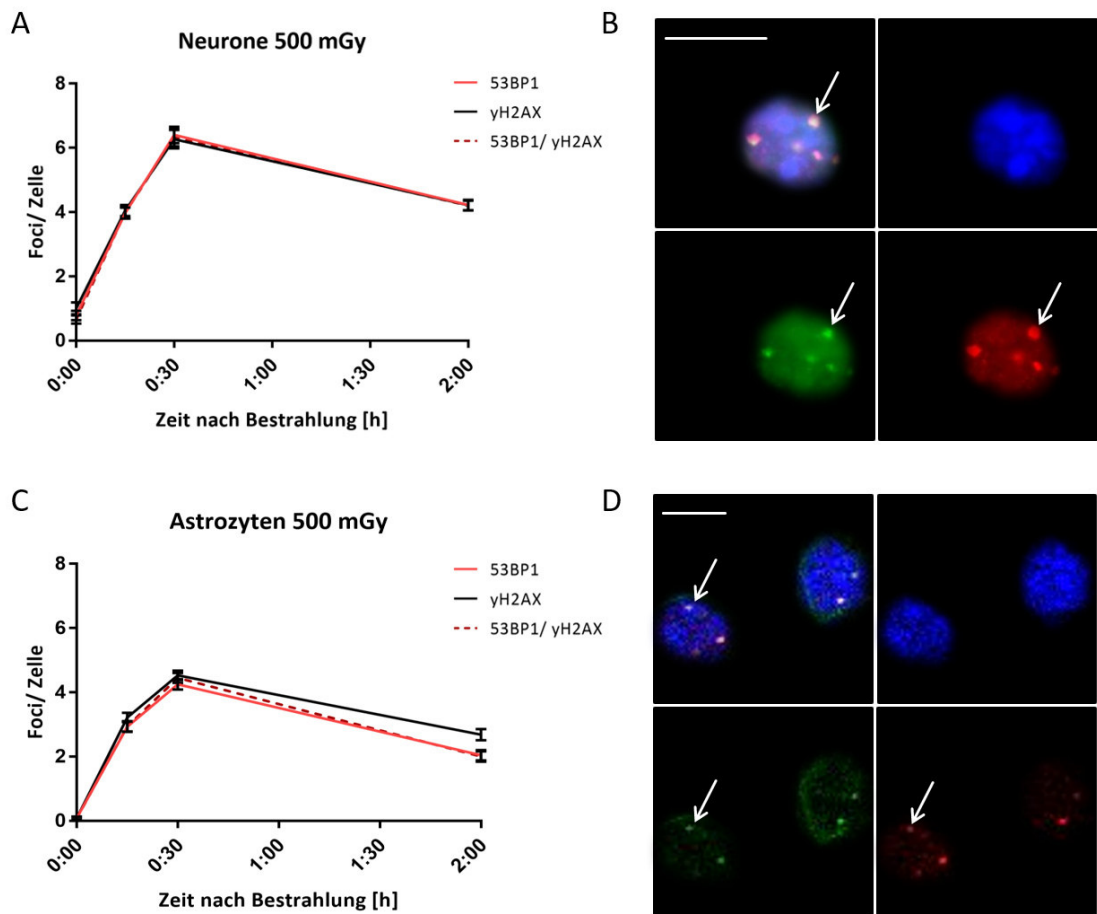


Abbildung 41: Ähnliche Reparaturverläufe der 53BP1- und γH2AX-Proteine während der frühen Phase der DSB-Reparatur in Neuronen und Astrozyten.

(A) Reparaturverlauf der Proteine γH2AX und 53BP1 in Neuronen, aufgetragen ist die durchschnittliche Anzahl von 53BP1-, γH2AX –Foci und die Anzahl ihrer Co-Lokalisationen zu den Zeitpunkten 0 min., 15 min., 30 min. und 2 h nach 500 mGy Bestrahlung. (B) Repräsentative Immunfluoreszenzfärbung eines Neuronenkerns 30 min. nach Bestrahlung. Markiert sind die Reparaturproteine γH2AX (grün) und 53BP1 (rot) und der Zellkern (blau). Der Maßstab beträgt 10 μm. (C) Reparaturverlauf der Proteine γH2AX und 53BP1 in Astrozyten. Aufgetragen ist die durchschnittliche Anzahl von 53BP1-, γH2AX-Foci und die Anzahl ihrer Co-Lokalisationen zu den Zeitpunkten 0 min., 15 min., 30 min. und 2 h nach 500 mGy Bestrahlung. (D) Repräsentative Immunfluoreszenzfärbung eines Astrozytenkerns zum 30 Minutenzeitpunkt. Markiert sind die Reparaturproteine γH2AX (grün) und 53BP1 (rot) und der Zellkern (blau). (B, D) Weiße Pfeile markieren beispielhaft die Detektion der γH2AX- und 53BP1-Foci. Der Maßstab beträgt 10 μm. (A, C) n= 3 unabhängige Experimente mit 40 Zellen/ Kulturbedingung/ Zeitpunkt; dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM.

Direkt im Anschluss einer Bestrahlung mit 500 mGy konnten in Neuronen, im Gegensatz zu Astrozyten, bereits γH2AX- und 53BP1-Proteine nachgewiesen werden (Abb. 41 A, C). Aus der Literatur ist bekannt, dass die ersten Zusammenlagerungen von 53BP1- bzw. γH2AX-Proteinen, an einem, durch ionisierende Strahlung ausgelösten DNS Doppelstrangbruch, erst nach ca. 10-15 Minuten sichtbar werden²²⁴. Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die Neurone schon von Beginn an eine gewisse Grundanzahl von DNS DSBs aufwiesen. Zum 15 Minuten Zeitpunkt wurden robuste

²²⁴ Schultz et al. 2000b; Anderson et al. 2001; Rogakou et al. 1998.

53BP1- und γ H2AX-Foci erkennbar, welche sich durch die Zusammenlagerung mehrerer Proteinmoleküle bildeten. Die Rekrutierung der Reparaturproteine fand ihren Höhepunkt zum 30 min. -Zeitpunkt, danach wurden sie wieder vom reparierten Bruch dissoziiert. Diese Beobachtungen stimmen mit Literaturangaben überein, in denen beschrieben wird, wie über die Aktivierung verschiedener Signalkaskaden, die einzelnen Reparaturproteine an den DNS DSB rekrutiert werden²²⁵. Dabei wird γ H2AX zuerst rekrutiert und 53BP1 folgt kurz danach, beide Proteine akkumulieren aber spätestens nach 30 Minuten am Bruch. Eine Co-Lokalisation beider Proteine, 30 min. nach der Röntgenstrahlung lässt darauf schließen, dass beide Reparaturproteine DNS Doppelstrangbrüche anzeigen.²²⁶ Aus Abbildung 41 geht hervor, dass beide Reparaturproteine, sowohl zum 30 Minuten-Zeitpunkt als auch zu allen anderen Zeitpunkten Co-lokalisierten. Dies spricht nicht nur für einen ähnlichen Rekrutierungsverlauf sondern ebenso für einen sehr ähnlichen Dissoziationsverlauf²²⁷. Die Dissoziation der γ H2AX und 53BP1 Proteine ist ebenso wichtig wie die Rekrutierung, da es den Abschluss der DNS-Reparatur bezeichnet²²⁸.

In den getesteten Astrozyten war der Reparaturverlauf der Proteine γ H2AX und 53BP1 sehr ähnlich zu den Neuronen. Allerdings wiesen die Astrozyten zum 0 min. Zeitpunkt keine sichtbaren 53BP1- oder γ H2AX-Foci auf. Erst 15 Minuten nach Bestrahlung wurden die ersten Foci sichtbar, bis zum 30 Minuten Zeitpunkt erreichten sie ihr Maximum um dann wieder abgebaut zu werden (2 h-Zeitpunkt). Die Co-Lokalisation beider Proteine war zu jedem überprüften Zeitpunkt vorhanden, nur zum 2 h Zeitpunkt stellte sich eine leichte Diskrepanz ein (Abb. 41 C). Aus diesen Daten ließ sich ebenfalls schließen, dass sowohl der anti- γ H2AX- als auch der anti-53BP1-Marker, zuverlässig DNS Doppelstrangbrüche aufzeigten. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde des Weiteren, um die Reparatur von DNS Doppelstrangbrüchen zu untersuchen, das Reparaturprotein 53BP1 ausgewählt.

5.3.3 Vergleich der DNS DSB-Reparaturverläufe der neuronalen Stammzellen und dessen Deszendenten nach 500 mGy Röntgenbestrahlung

Das Reparaturprotein 53BP1 besticht nicht nur durch seine Eigenschaft nur einen Focus pro DNS DSB auszubilden²²⁹. Es wird zudem direkt an die Bruchenden der DNS rekrutiert, dort schützt es die freiliegenden DNS-Enden vor der Resektion der homologen Rekombinations-Reparaturmaschinerie. Dadurch trägt das Reparaturprotein entscheidend dazu bei, den Reparaturweg der nicht-homologen Endverknüpfung (NHEJ, *engl. non-homologous end joining*) über der homologen Rekombination zu

²²⁵ Sak und Stuschke 2010; Bekker-Jensen et al. 2005.

²²⁶ Ward et al. 2003; Schultz et al. 2000b; Bekker-Jensen et al. 2005; Sak und Stuschke 2010.

²²⁷ Ward et al. 2003; Kao et al. 2003; Chronis und Rogakou 2007.

²²⁸ Schultz et al. 2000a.

²²⁹ Anderson et al. 2001.

favorisieren²³⁰. Dies ist besonders wichtig, wenn die Reparaturkinetik von neuronalen Stammzellen mit der von Neuronen und Gliazellen verglichen werden soll. Im Gegensatz zu den Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten befinden sich die neuronale Stammzellen noch im mitotischen Zustand und sind somit im Stande, im Gegensatz zu den Deszendenten, DNS DSBs entweder über die homologe Rekombination oder über die nicht-homologe Endverknüpfung zu reparieren²³¹. Um nun auch die Kinetik der Stammzellen mit den anderen Zellen ins Verhältnis zu setzen, ist es unerlässlich, den Weg der homologen Rekombination größtmöglich auszuschließen. Das ist zum einen mit der Wahl des Reparaturproteins und zum anderen mit der Markierung der Zellzyklusphase umsetzbar. So wurden nur Stammzellen ausgewertet die das Protein Cyclin D1 exprimierten. Cyclin D1 ist ein Protein, welches während der G1 Phase des Zellzyklus stark hochreguliert und in der S-Phase schnell wieder abgebaut wird. Durch diese Eigenschaften kann es als Marker für Zellen, die sich gerade in der G1 Phase, befinden verwendet werden²³².

Die Deszendenten- und Stammzellkulturen wurden mit einer Dosisleistung von 500 mGy ionisierender Strahlung bestrahlt und die Anzahl der 53BP1-Foci nach 30 min., 2 h, 4 h und 6 h bestimmt. Eine sham Bestrahlung (=Kontrolle) wurde gewährleistet durch eine 2 mm dicke Bleiplatte die zwischen Strahlenquelle und Zellkulturware platziert wurde (s. Kapitel 5.2.4). Damit nur durch Bestrahlung erzeugte DSBs in die Auswertung eingingen, wurde die Anzahl, der in sham behandelten Kontrollen auftretenden Foci, welche beispielsweise durch den Zellmetabolismus erzeugt werden, als natürlicher Hintergrund abgezogen²³³.

²³⁰ Bunting et al. 2010; Bugreev und Mazin 2004; Bouwman et al. 2010.

²³¹ Branzei und Foiani 2008; Featherstone und Jackson 1999.

²³² Schafer 1998; Stacey 2003.

²³³ Valko et al. 2007; Kovacic et al. 2005; Ridnour et al. 2004; Valko et al. 2001.

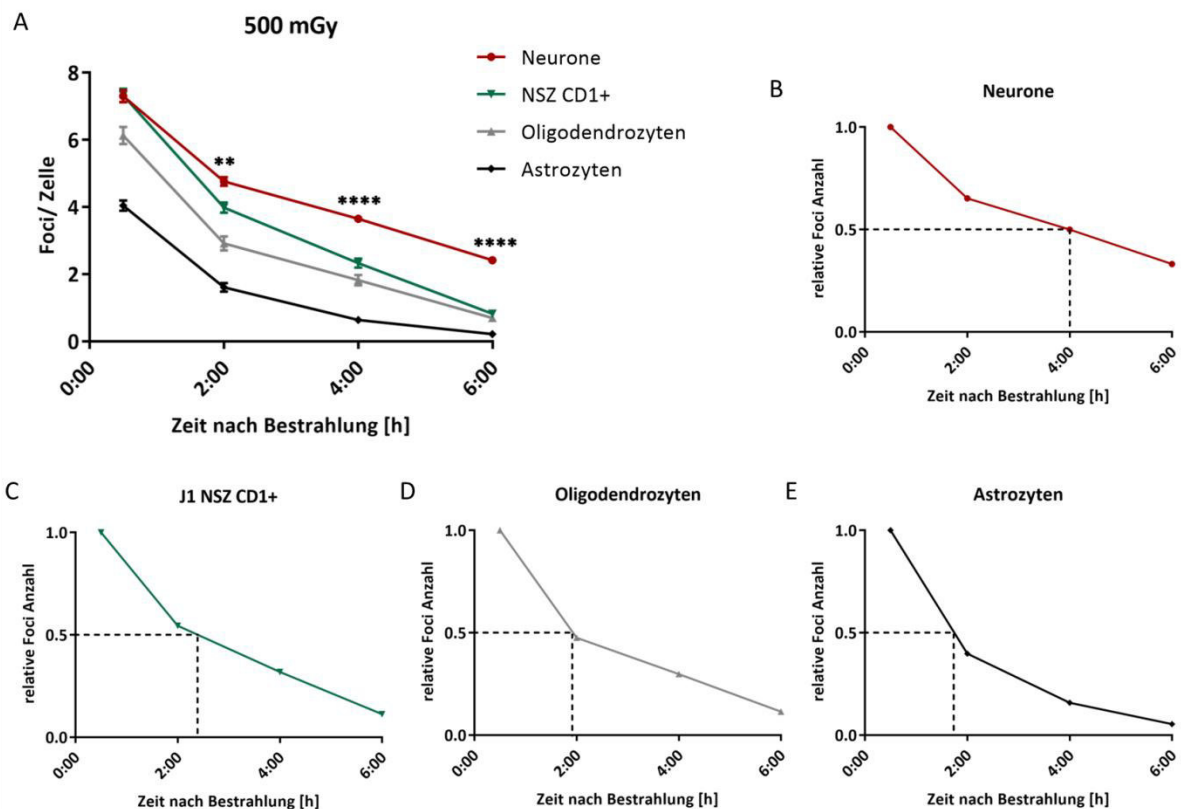


Abbildung 42: Neurone zeigten Defizite in der späten Phase der DNS DSB-Reparatur.

(A) Die Kulturen wurden mit 500 mGy bestrahlt und zu den Zeitpunkten 30 min., 2 h, 4 h und 6 h nach Bestrahlung fixiert. Zu jeder Probe wurde eine Kontrolle mitgeführt. Aufgetragen ist der bereinigte Mittelwert (ohne Hintergrund-Foci) aus je 40 Zellen zu n Versuchen je Zeitpunkt und Zelltyp: Neurone [30 min. n = 7, 2 h n = 7, 4 h = 3, 6 h n = 3], NSZ CD1+ [30 min. n = 5, 2 h n = 5, 4 h = 4, 6 h n = 3], Oligodendrozyten [30 min. n = 4, 2 h n = 3, 4 h = 3, 6 h n = 3], Astrozyten [30 min. n = 6, 2 h n = 5, 4 h = 4, 6 h n = 4]. (B - E) Relative Foci Anzahl, nach Normierung auf den 30 min.-Zeitpunkt. Eingezeichnet ist der Zeitpunkt zu dem die Hälfte aller strahleninduzierter Foci repariert wurden. Signifikanzen wurden ausgerechnet mit dem Statistiktest: Kruskal-Wallis, $p > 0,1234$ (ns), $p < 0,0332$ (*), $p < 0,0021$ (**), $p < 0,0002$ (***), $p \leq 0,0001$ (****). Teile der Datensätze wurden angefertigt von Frau Nina Trautwein im Rahmen ihrer Bachelorthesis.

Aus Abbildung 42 A geht hervor, dass sowohl die Anzahl der strahleninduzierten DNS DSBs als auch die Reparatur dieser Brüche in den Zellkulturen individuelle Unterschiede aufwiesen. Bis zu 30 Minuten benötigten die Zellen um das Reparaturprotein 53BP1 zu allen strahleninduzierten Doppelstrangbrüchen zu rekrutieren. Der 30 min.-Zeitpunkt zeigte somit die maximale Anzahl an strahleninduzierten DNS DSBs nach 500 mGy Röntgenbestrahlung an. Interessanterweise zeigten sich schon bei der Anzahl an strahleninduzierten DNS DSBs individuelle Unterschiede in den Zellkulturen. So war die Anzahl der DNS DSBs in den Neuronen-, Oligodendrozyten- und Stammzellkulturen signifikant höher als in der Astrozytenkultur [nicht in Abb. 42 A dargestellt, $p \leq 0,0001$ (****): Astrozyten = $4,1 \pm 0,2$ Foci/ Zelle, Neurone = $7,3 \pm 0,2$ Foci/ Zelle, Oligodendrozyten = $6,1 \pm 0,3$ Foci/ Zelle, NSZ = $7,3 \pm 0,2$ Foci/ Zelle]. Die signifikant geringere Anzahl an strahleninduzierten DSBs in den Astrozyten hing mit ihrem effizienten Radikalpuffersystem zusammen, welches sie vor freien

Radikalen die mit Molekülen des DNS Stranges reagieren könnten, schützt²³⁴. Dieses Puffersystem stützt sich hauptsächlich auf das Tripeptid Glutathion (GSH, *engl. γ-L-glutamyl-L-cysteinyl-glycine*). Das Besondere am GSH-Monomer ist, dass es direkt mit einer radikalen Sauerstoffspezies (ROS) reagieren kann. Bei dieser Reaktion, katalysiert durch die Glutathion-Peroxidase, überträgt das GSH-Monomer ein Elektron an die reaktive Sauerstoffspezies und macht sie dadurch unschädlich. Das nun oxidierte GSH bildet mit einem zweiten oxidierten Monomer, unter Ausbildung einer Disulfidbrücke, ein Dimer, das GSSG (Glutathiondisulfid). Das entstandene Dimer kann durch die enzymatische Reaktion der Glutathion-Reduktase, durch Verbrauch eines Reduktionsäquivalent (NADPH/H⁺) wieder zu zwei GSH Monomeren, reduziert werden²³⁵. Astrozyten besitzen nicht nur einen höheren GSH-Level als z.B. die Neurone, das gesamte Glutathion-System ist effizienter. Dadurch werden zellschädigende ROS schneller beseitigt²³⁶.

Doch nicht nur die Anzahl induzierter DNS DSBs unterlag individuellen Unterschieden, auch die Reparatur der DSBs verlief in den Zellkulturen nicht einheitlich. Obwohl in beiden Kulturen die gleiche Anzahl an DSBs induziert wurde (30 min.-Zeitpunkt: Neurone= $7,3 \pm 0,2$ Foci/ Zelle, NSZ= $7,3 \pm 0,2$ Foci/ Zelle) wiesen die Neuronen im weiteren Verlauf der DSB-Reparatur signifikante Defizite auf. So konnte im direkten Vergleich zwischen Neuronen und neuronalen Stammzellen zum jedem Zeitpunkt während der DSB-Reparatur ein signifikanter Unterschied in der Anzahl verbleibender DNS DSBs festgestellt werden [2 h: Neurone= $4,8 \pm 0,1$ Foci/ Zelle, NSZ= $4 \pm 0,2$ Foci/ Zelle, $p < 0,0021(**)$, 4 h: Neurone= $3,7 \pm 0,1$ Foci/ Zelle, NSZ= $2,3 \pm 0,1$ Foci/ Zelle, $p \leq 0,0001(****)$, 6 h: Neurone= $2,4 \pm 0,1$ Foci/ Zelle, NSZ= $0,8 \pm 0,1$ Foci/ Zelle, $p \leq 0,0001(****)$] (Abb. 42 A). Um zu überprüfen ob die Reparatur der DNS DSBs in den Neuronen im Vergleich zu den Gliazellen (Astrozyten und Oligodendrozyten) ebenfalls verlangsamt war, wurde die Anzahl der 53BP1 Foci zu den Zeitpunkten 2 h, 4 h und 6 h auf die maximale Anzahl an 53BP1 induzierten Foci (zum 30 min.-Zeitpunkt) normiert (Abb. 42 B-E). Die Normierung ergab, dass sowohl die Gliazellen als auch die neuronalen Stammzellen die Hälfte der strahleninduzierten DNS DSBs innerhalb von ca. zwei Stunden reparieren konnten (Astrozyten= 1 h 46 min., Oligodendrozyten= 1 h 55 min., NSZ= 2 h 24 min.). Die Neurone hingegen benötigten das Doppelte der Zeit (4 h 2 min.) um die Hälfte der strahleninduzierten DNS DSBs zu reparieren. Die stark verzögerte Reparatur führte dazu, dass die Neurone zum 6 h-Zeitpunkt im Mittel das Dreifache an 53BP1-Foci aufwiesen als die NSZ, das 3,5 fache als die Oligodendrozyten und im Vergleich zu den Astrozyten wiesen sie sogar 11 mal so viele

²³⁴ Dringen und Hamprecht 1997; Dringen et al. 1998.

²³⁵ Cooper und Kristal 1997; Meister und Anderson 1983.

²³⁶ Dringen 2000; Dringen et al. 1999; Desagher et al. 1996; Dringen et al. 1998.

Foci auf [Neurone= $2,4 \pm 0,1$ Foci/ Zelle, NSZ= $0,8 \pm 0,1$ Foci/ Zelle, $p \leq 0,0001$ (****), Oligodendrozyten= $0,7 \pm 0,1$ Foci/ Zelle, $p \leq 0,0001$ (****), Astrozyten= $0,2 \pm 0,1$ Foci/ Zelle, $p \leq 0,0001$ (****)].

Im Folgenden sollte analysiert werden, ob die hohe 53BP1-Foci Anzahl der Neuronen zu allen Reparaturzeitpunkten tatsächlich auf eine verlangsamte Reparatur von DNS DSBs zurückzuführen war, oder ob die Glia – und Stammzellen so strahlensensitiv waren, dass sie anstatt Reparaturmechanismen, den programmierten Zelltod einleiteten. Um zu überprüfen ob die Zellen Apoptose einleiteten, wurde ein c Caspase-3 Assay durchgeführt. Caspase-3 ist eine Protease und gehört zu der Familie der Effektor-Caspasen die während der Apoptose entscheidend sind. Aktiviert wird die Caspase indem sie durch die Apoptose-initiator Caspase-8 gespalten wird zur *cleaved* Caspase-3 (c Caspase-3)²³⁷. Ein Höhepunkt des programmierten Zelltodes wird nach Röntgenbestrahlung häufig zwischen 4 und 6 Stunden beobachtet²³⁸. Die Markierung der aktivierten Caspase-3 Proteine, als Nachweis der eingeleiteten Apoptose, erfolgte 4 h, 6 h und 8 h nach Bestrahlung in den neuronalen Stammzellen und Gliazellen (Abb. 43).

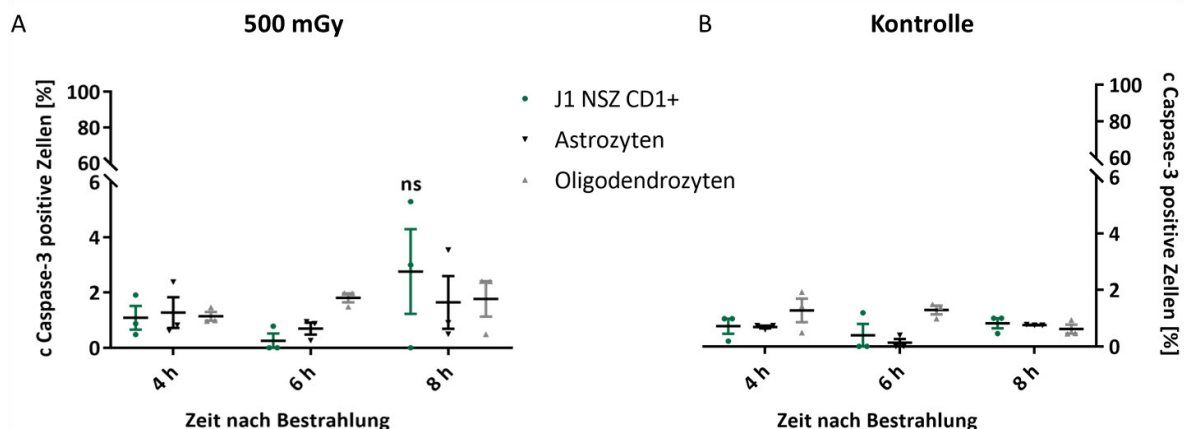


Abbildung 43: Keine erhöhte Apoptose in den neuronalen Stamm- und Gliazellen nach 500 mGy Bestrahlung.

Zellen wurden mit 500 mGy Röntgenstrahlung (A) oder abgeschirmt (B) bestrahlt. Die Abschirmung der Kontrollzellen erfolgte wie unter Kapitel 5.2.4 beschrieben mit Blei. 4 h, 6 h und 8 h nach Bestrahlung wurden die Zellen fixiert und das aktivierte Apoptoseprotein Caspase-3 nachgewiesen. Für jeden Datensatz pro Zelltyp wurden > 600 Zellen pro Versuch (n=3) ausgewertet. Aufgetragen ist der Mittelwert mit SEM. Es konnten keine Signifikanzen mit dem Tukey-Mehrfachvergleichstest festgestellt werden; $p > 0,1234$ (ns).

In keiner der Zelltypen konnte eine signifikant erhöhte Apoptoserate nach 500 mGy Bestrahlung festgestellt werden (Abb. 43 A). In den ersten sechs Stunden stieg der Prozentsatz der cleaved Caspase-3 positiven Zellen nach Bestrahlung nicht über 2,8 % (4 h: NSZ= $1,1 \pm 0,4$ %, Astro.= $1,3 \pm 0,6$ %, Oligo.= $1,1 \pm 0,2$ %, 6 h: NSZ= $0,3 \pm 0,3$ %, Astro.= $0,7 \pm 0,2$ %, Oligo.= $1,8 \pm 0,2$ %). Dies entsprach in etwa dem Prozentsatz der Kontrollfraktion (4 h: NSZ= $0,7 \pm 0,3$ %, Astro.= $0,7 \pm 0,1$ %, Oligo.= $1,3 \pm 0,4$ %, 6 h:

²³⁷ McIlwain et al. 2013; Nicholson et al. 1995; Fernandes-Alnemri et al. 1994.

²³⁸ Loree et al. 2006; Watanabe et al. 2006; Chi et al. 2017; Weber und Barbaro 2006; Jani et al. 2016.

NSZ= $0,4 \pm 0,4$ %, Astro.= $0,1 \pm 0,1$ %, Oligo.= $1,3 \pm 0,2$ %) (Abb.: 43 B). Auch nach 8 h erhöhte sich die Apoptoserate nach Bestrahlung nicht signifikant in den Glia- und Stammzellen [8 h 500 mGy: NSZ= $2,8 \pm 1,5$ %, Astro.= $1,7 \pm 1,0$ %, Oligo.= $1,8 \pm 0,6$ %, 8 h Kontrolle: NSZ= $0,8 \pm 0,2$ %, $p > 0,1234$ (ns), Astro.= $0,8 \pm 0$ %, $p > 0,1234$ (ns), Oligo.= $0,6 \pm 0,2$ %, $p > 0,1234$ (ns)]. Insgesamt konnte nachgewiesen werden, dass die Glia- und Stammzellen keine Apoptose nach 500 mGy Röntgenbestrahlung einleiteten. Dies erhärtete die Hypothese, dass die Neuronen eine verlangsamte Reparatur aufwiesen im Vergleich zu Astrozyten, Oligodendrozyten und neuronalen Stammzellen.

5.3.4 Verbesserte Reparatur strahleninduzierter DNS DSBs in Neuronen nach Glutamat Behandlung

Die unter Kapitel 5.2.8 angefertigten Immunfluoreszenzfärbungen der Neuronenkulturen zeigten, dass diese aus einer Mischung aus exzitatorischen und inhibitorischen Neuronen bestanden. Sowohl Untereinheiten des NMDA- sowie des GABA-Rezeptors konnten nachgewiesen werden. Besonders stark war die Präsenz der NR1 Untereinheit des NMDA-Rezeptors ebenso wie des AMPA-Rezeptors und dem dazugehörigen Bindeprotein PSD95, welches die Anzahl der AMPA Rezeptoren in der glutamatergen exzitatorischen Synapse kontrolliert und somit die Signaltransduktion verstärken kann²³⁹. Diese Beobachtungen ließen die Vermutung aufkommen, dass das Signalmolekül Glutamat, welches als hauptexzitatorischer Neurotransmitter im ZNS²⁴⁰ für das neuronale Zellüberleben eine entscheidende Rolle spielt²⁴¹, ebenso Einfluss auf die Reparatur von strahleninduzierten DNS Doppelstrangbrüchen haben könnte²⁴².

Glutamat kommt im zentralen Nervensystem in unterschiedlichen Konzentrationen vor. Für viele Signalaktivierungen ist eine kurze erhöhte Konzentration des Neurotransmitters unerlässlich. Zu lang anhaltende, hohe extrazelluläre Konzentrationen führen hingegen zu schwerwiegenden zellulären Schäden, die unter dem Begriff Exzitotoxizität zusammengefasst werden²⁴³. Exzitotoxizität beschreibt den Vorgang der Überaktivierung von neuronalen Glutamatrezeptoren, in Folge dessen eine extrem erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration zur Einleitung der Apoptose führt²⁴⁴. Aufgrund dessen ist die Zirkulation von Glutamat im intra- und extrazellulären Bereich präzise reguliert. Glutamat wird aktiv, durch die Proteinfamilie der exzitatorischen Aminosäuren-Transporter (EAATs: *engl. excitatory amino acid transporters*), aus dem synaptischen Spalt gegen seinen Konzentrationsgradienten ins Zytosol transportiert. Hauptsächlich werden diese von Astrozyten exprimiert, teilweise auch von

²³⁹ Chen et al. 2000.

²⁴⁰ Hertz 2006.

²⁴¹ Jansson und Åkerman 2014; Akaike 1994; Erecinska 1990; Brazel et al. 2005.

²⁴² Yang et al. 2011.

²⁴³ Hardingham et al. 2002; Vanhoutte und Bading 2003; Xu et al. 2009.

²⁴⁴ Churn et al. 1993; Choi et al. 1987; Akaike 1994; Olney 1982.

GABAergen Neuronen. Häufig sind die EAATs in kritischen Positionen nahe von glutamatergen Synapsen lokalisiert um eine Glutamatüberflutung zu verhindern²⁴⁵. In Astrozyten bzw. Oligodendrozyten wird das aufgenommene Glutamat in Abhängigkeit von ATP durch das Enzym Glutamin-Synthetase in Glutamin konvertiert. Sowohl Gliazellen als auch Neurone besitzen Glutamin-Transporter. Im sogenannten Glutamin-Zirkel wird das gebildete Glutamin aus den Gliazellen transportiert und aus dem extrazellulärem Raum von Neuronen wieder aufgenommen um dort wieder in Glutamat umgewandelt zu werden. Neurone haben somit zwei Möglichkeiten Glutamat zu produzieren, entweder über den Recyclingweg durch die Glutamin-Konvertierung oder durch den eigenen Metabolismus, in welchem Glukose und Derivate von Aminosäuren zu Glutamat umgewandelt werden²⁴⁶.

Im Zellsystem dieser Arbeit wurde den Neuronen ein Weg der Glutamatproduktion genommen. Da in der Neuronenkultur weder Astrozyten noch Oligodendrozyten vorhanden waren, konnte kein Glutamin-Zirkel entstehen. Die Neurone waren abhängig von der Glukose und den Aminosäuren im Medium und der zusätzlichen Gabe von Glutamat. Damit wurde ein System geschaffen das aktiv modifiziert werden konnte. Ein spezifisch gesetzter Glutamatimpuls sollte in den Neuronen über die Aktivierung ihrer ionotropen Glutamatrezeptoren eine Signalkaskade auslösen, ohne dass Astrozyten die Möglichkeit hatten das zusätzliche Glutamat zuvor aus dem synaptischen Spalt zu transportieren. Im Folgenden sollte nun analysiert werden, ob die Aktivierung der Glutamatrezeptoren in den Neuronenkulturen einen positiven Einfluss auf die Reparatur von strahleninduzierten DNS DSBs zur Folge hatte.

Der gesetzte Glutamatimpuls beinhaltete die Behandlung der Neuronenkultur mit 30 μ M Glutamat und 10 μ M Glyzin über Nacht. Die Zugabe von Glyzin war unerlässlich um NMDA-Rezeptoren zu aktivieren und damit den Ioneneinstrom (Calcium, Natrium, Kalium) in die Zelle zu ermöglichen²⁴⁷. Calcium dient als essentielles Signalmolekül zur Aktivierung verschiedenster Signalkaskaden²⁴⁸. Die Konzentration von 30 μ M Glutamat ist in der Literatur als moderat beschrieben und sollte in den Neuronen nicht zur Exzitotoxizität führen²⁴⁹. Da allerdings der Glutamatimpuls über einen langen Zeitraum gesetzt wurde, musste im Vorfeld eine Zunahme der Apoptoserate bzw. eine Verminderung des Zellmetabolismus, durch die Glutamatbehandlung ausgeschlossen werden. Um dies zu gewährleisten wurde ein Apoptose- und ein MTT-Assay durchgeführt (Abb. 44 A, B).

²⁴⁵ O'Shea 2002; Zheng et al. 2008.

²⁴⁶ Erecinska 1990.

²⁴⁷ Watkins und Evans 1981; Johnson und Ascher 1987.

²⁴⁸ Berridge 2017; Krebs 2007.

²⁴⁹ Woo et al. 2012; Zhang et al. 2019.

Abbildung 44 A zeigt keine signifikante Erhöhung des aktivierten c Caspase-3 Proteins 4 h, 6 h oder 8 h nach einer Bestrahlung mit 500 mGy in den Neuronenkulturen [4 h: 500 mGy= $1,9 \pm 0,3$ %, Kontrolle= $2,2 \pm 1,1$ %, $p > 0,1234$ (ns), 6 h: 500 mGy= $1,5 \pm 0,3$ %, Kontrolle= $0,9 \pm 0,5$ %, $p > 0,1234$ (ns), 8 h: 500 mGy= $1,7 \pm 0,1$ %, Kontrolle= $1,6 \pm 0,3$ %, $p > 0,1234$ (ns)]. Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass eine Bestrahlung mit einer Dosis von 500 mGy zu keinem Anstieg der Apoptoserate führte. Auch eine kombinierte über Nacht-Behandlung mit Glutamat und anschließender Röntgenbestrahlung (500 mGy) zeigte keine Erhöhung der Apoptoserate [4 h: Glu+ 500 mGy= $0,8 \pm 0,2$, $p > 0,1234$ (ns), 6 h: Glu+ 500 mGy= $0,8 \pm 0,1$, $p > 0,1234$ (ns), 8 h: Glu+ 500 mGy= $2,4 \pm 0,5$, $p > 0,1234$ (ns)]. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die gewählte Behandlung keine Exzitotoxizität auslöste. Der Zellmetabolismus wurde über die Fähigkeit der Kultur, den gelblichen Farbstoff MTT in blau-violettes Formazan umzuwandeln, überprüft. Dabei konnten keine behandlungsabhängigen Unterschiede in der Zellvitalität festgestellt werden (500 mGy= $0,98 \pm 0,05$, Glu üN/ 500 mGy= $0,96 \pm 0,04$, Glu üN= $1 \pm 0,05$) (Abb. 44 B).

Nachdem ausgeschlossen werden konnte, dass Glutamat- und/oder Röntgenstrahlung zur Apoptose oder einer Verminderung des Zellmetabolismus in den Neuronenkulturen führte, sollte das Reparaturverhalten analysiert werden. Dazu wurden verschiedene Behandlungsstrategien gewählt. Die erste Strategie beinhaltete genau einen Glutamatimpuls über Nacht mit anschließender Röntgenbestrahlung von 500 mGy. Die zweite Strategie bestand aus einem zweiten Glutamatimpuls, welcher direkt auf den ersten folgte und sowohl die 500 mGy Röntgenbestrahlung, als auch die Reparatur der strahleninduzierten DNS DSBs überdauerte (Abb. 44 C).

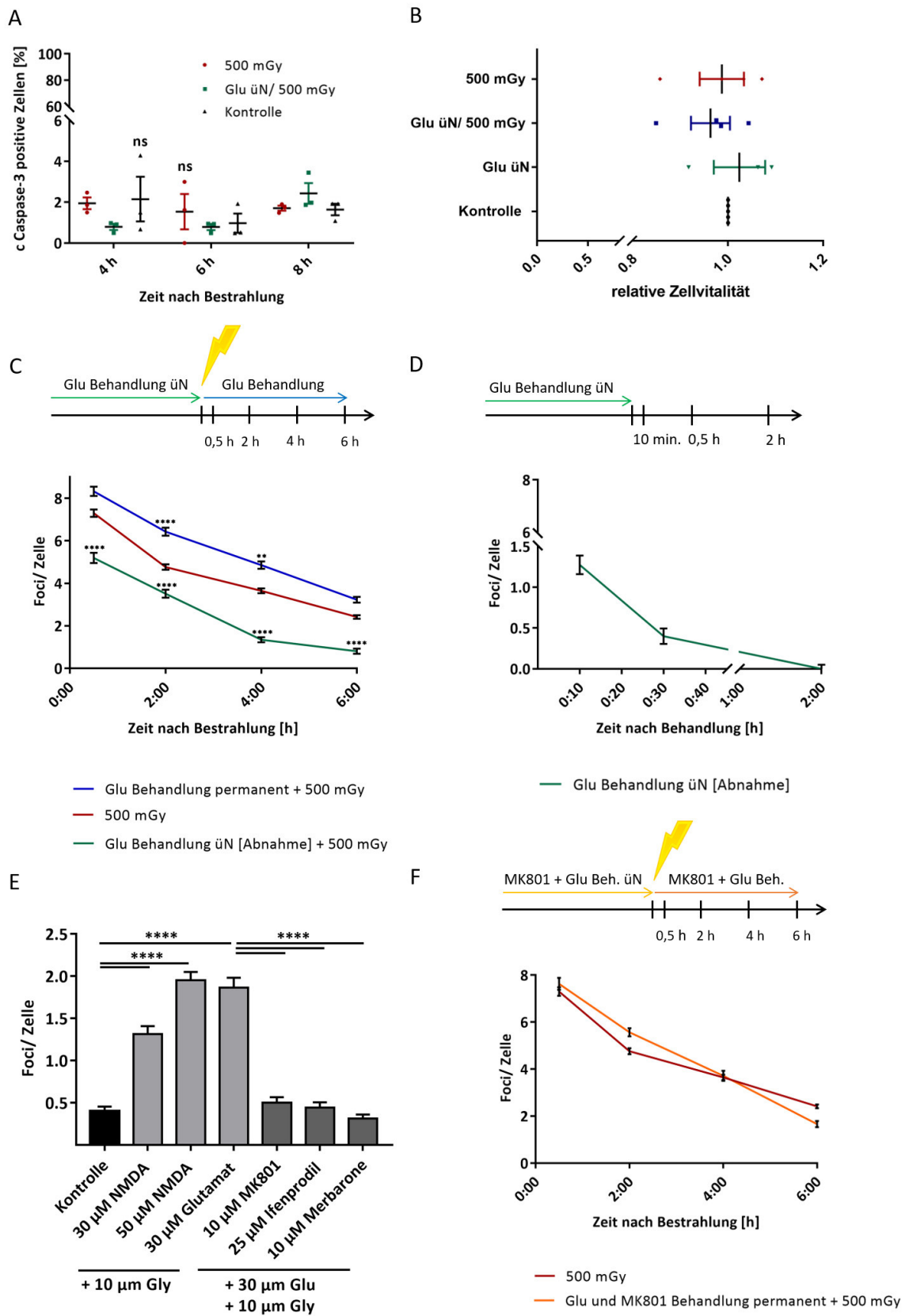


Abbildung 44: Glutamat steigerte die Reparaturreffizienz von strahleninduzierten Doppelstrangbrüchen in Neuronen.

(A) Apoptose-Assay der reinen Neuronenkultur nach Behandlung mit Glu/ Gly und 500 mGy Bestrahlung, nur Bestrahlung und keiner Behandlung, aber mit Bleiabdeckung bestrahlt (Kontrolle). Pro Datensatz und Versuch (n= 3) wurden > 600 Zellen ausgewertet. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Bedingungen mit dem Tukey-Mehrfachvergleichstest festgestellt werden, $p > 0,1234$ (ns). (B) MTT-Assay der Neuronenkultur nach Behandlung mit Glu/ Gly üN und Bestrahlung, nur Bestrahlung bzw. nur Glu-Behandlung und keiner Behandlung, aber mit Bleiabdeckung bestrahlt (Kontrolle). MTT-Reagenz wurde kurz nach Bestrahlung hinzugegeben (Kontrolle n= 5, Glu üN n= 3, Glu üN/ 500 mGy n= 4, 500 mGy n= 4). Es konnten keine Signifikanzen nach dem Einstichproben t-Test ermittelt werden; $p > 0,1234$ (ns). (C) Experimentierschema und Reparaturkinetik der 53BP1-Foci in Neuronen nach einer über Nacht Behandlung mit Glutamat und anschließender Bestrahlung ohne weiteren Glutamatimpuls (in Grün), mit weiteren Glutamatimpuls (in Blau) oder ohne jegliche Glutamatbehandlung (in Rot). Fixiert und die Anzahl der 53BP1-Foci wurden ermittelt zu den Zeitpunkten 30 min., 2 h, 4 h und 6 h. (D) Experimentierschema und Verlauf der Reparatur der glutamatinduzierten Foci. Neurone wurden über Nacht mit Glutamat behandelt und zu den Zeitpunkten 10 min., 0,5 h und 2 h fixiert und die Anzahl der 53BP1-Foci bestimmt. (E) Ausgezählte 53BP1-Foci nach der Behandlung der Neurone mit den Glutamatrezeptor-Agonisten NMDA und Glutamat bzw. mit den NMDAR-Antagonisten MK801 und Ifenprodil, sowie mit dem Top2B Inhibitor Merbarone. (F) Experimentierschema und ausgezählte Foci in den Neuronen die üN mit Glutamat und MK801, sowie nach Bestrahlung mit 500 mGy mit beiden Agenzien behandelt wurden. (E - F) Ausgewertet wurden pro Datensatz > 160 Zellen in mind. drei voneinander unabhängigen Experimenten. Aufgetragen ist der normierte Mittelwert und SEM. Signifikanzen wurden durch den Kruskal-Wallis-Test ermittelt; $p < 0,0021$ (**), $p \leq 0,0001$ (****).

Erstaunlicherweise führten die Glutamat-Behandlungsstrategien zu konträren Ergebnissen. Während ein einmaliger Glutamatimpuls (über Nacht) zu einer signifikant verbesserten Reparatur der strahleninduzierten DNS DSBs führte, stieg die Anzahl der 53BP1-Foci erheblich in den Neuronenkulturen die permanent mit Glutamat behandelt wurden (Abb. 44 C). So wiesen die einmalig mit Glutamat behandelten Neuronenkulturen zu jedem Zeitpunkt der strahleninduzierten DSB-Reparatur signifikant weniger 53BP1-Foci auf, als die nicht mit Glutamat behandelte Neuronenkultur [2 h: 500 mGy= $4,8 \pm 0,1$ Foci/ Zelle, Glu+ 500 mGy= $3,5 \pm 0,2$ Foci/Zelle, $p \leq 0,0001$ (****), 4 h: 500mGy= $3,7 \pm 0,1$ Foci/ Zelle, Glu+ 500 mGy= $1,3 \pm 0,1$ Foci/Zelle, $p \leq 0,0001$ (****)]. Sodass zum 6 h-Zeitpunkt die glutamatbehandelten Neurone nur noch $0,8 \pm 0,1$ Foci pro Zelle aufwiesen, während es bei den unbehandelten, nur bestrahlten, dreimal so viele waren [$2,4 \pm 0,1$ Foci/ Zelle, $p \leq 0,0001$ (****)]. Die permanent mit Glutamat behandelten Neurone zeigten hingegen zu jedem Zeitpunkt eine zusätzliche Erhöhung der 53BP1-Foci [30 min.: 500 mGy= $7,3 \pm 0,2$ Foci/ Zelle, Glu perm.+ 500 mGy= $8,3 \pm 0,2$ Foci/ Zelle, 2 h.: 500 mGy= s.o., Glu perm.+ 500 mGy= $6,4 \pm 0,2$ Foci/ Zelle, $p \leq 0,0001$ (****), 4 h: 500 mGy= s.o., Glu perm.+ 500 mGy= $4,9 \pm 0,2$ Foci/ Zelle, $p < 0,0021$ (**), 6 h: 500 mGy= s.o., Glu perm.+ 500 mGy= $3,2 \pm 0,1$ Foci/ Zelle].

Die Ergebnisse deuteten an, dass Glutamat selbst in der Lage war, Signalkaskaden zu aktivieren die wiederum DNS DSBs in Neuronen bildeten. Um diese Hypothese zu überprüfen wurden die Neuronenkulturen über Nacht mit Glutamat behandelt, der Glutamatimpuls durch das Wechseln des Mediums abgestoppt und die Zellen ohne Bestrahlung nach 10 min. bzw. 30 min. und 2 h fixiert (Abb. 44 D). Glutamat bewirkte die Induktion von 53BP1-Foci in Neuronen (10 min.: $1,3 \pm 0,1$ Foci/ Zelle). Diese induzierten Foci wurden schnell, innerhalb von 30 Minuten, fast vollständig repariert ($0,4 \pm 0,1$ Foci/ Zelle). Die Behandlung mit Glutamat führte somit einerseits selbst zur Induktion von DNS DSBs und gleichzeitig ermöglichte es eine signifikant effizientere Reparatur

strahleninduzierter DNS DSBs in Neuronen. Die Ergebnisse bestärkten die Hypothese, dass Glutamat einen positiven Effekt auf die Reparatur strahleninduzierter DNS DSBs in Neuronen hatte.

Um herauszufinden über welchen Signalweg die Aktivierung von Glutamatrezeptoren die Induktion von DNS DSBs erzeugt, wurden Experimente mit spezifischen Agonisten und Antagonisten des glutamatergen Systems durchgeführt. Differenzierte Neuronenkulturen die über Nacht mit Glutamatagonisten, wie Glutamat/ Glyzin oder NMDA/ Glyzin behandelt wurden, wiesen eine signifikant erhöhte Induktion an 53BP1-Foci auf (Abb. 44 E). Durch die Steigerung der NMDA Konzentration konnte sogar eine dosisabhängige Foci Induktion beobachtet werden (30 μ M NMDA/ 10 μ M Glyzin= $1,3 \pm 0,1$ Foci/ Zelle, 50 μ M NMDA/ 10 μ M Glyzin= $1,95 \pm 0,1$ Foci/Zelle). Die Behandlung der Neuronen mit MK801 (+Glu/ Gly) über Nacht hingegen, zeigte keine Steigerung der 53BP1-Foci [Kontrolle= $0,4 \pm 0,05$ Foci/Zelle, 10 μ M MK801(+Glu/ Gly)= $0,5 \pm 0,07$ Foci/ Zelle]. MK801 ist ein spezifischer, nicht-kompetitiver Antagonist des NMDA-Rezeptors, der durch seine Bindung im inneren der Kanalpore den Einstrom von Ionen ins Zellinnere verhindert²⁵⁰. Interessanterweise wurde die Induktion von 53BP1-Foci auch durch den Einsatz von Ifenprodil inhibiert [25 μ M Ifenprodil (+Glu/Gly)= $0,4 \pm 0,06$ Foci/ Zelle]. Ifenprodil wirkt als nicht-kompetitiver Antagonist von NMDA-Rezeptoren, die die spezielle Untereinheit NR2B aufweisen²⁵¹. Dass die Induktion der DNS DSBs, trotz Behandlung mit Glutamat, durch den Einsatz des Topoisomerase II-beta (Top2B)-Inhibitors Merbarone²⁵² inhibiert werden konnte, zeigte einen Zusammenhang zwischen glutamatergen System und Top2B (10 μ M Merbarone (+Glu/ Gly)= $0,3 \pm 0,05$ Foci/ Zelle). Das Enzym Top2B soll die Induktion von DNS DSBs in spezifischen Promotorregionen von so genannten *immediate-early genes* (IEGs) medieren und damit ihre Transkription ermöglichen²⁵³. IEGs sind entscheidend für die neuronale Funktionalität²⁵⁴.

Um zu überprüfen, ob die NMDA-Rezeptoren aus dem glutamatergen System verantwortlich für die effizientere Reparatur von strahleninduzierten DNS DSBs waren, wurden die Neuronenkulturen über Nacht mit MK801 und Glutamat/Glyzin behandelt. Bei Anwesenheit von MK801 konnte die vorher beobachtete effizientere Reparatur strahlungsinduzierter Schäden nach Glutamat-/Glyzinbehandlung aufgehoben werden [10 μ M MK801 (+Glu/Gly): 2 h= $5,6 \pm 0,2$ Foci/ Zelle, 4 h= $3,7 \pm 0,2$ Foci/ Zelle, 6 h= $1,7 \pm 0,1$ Foci/ Zelle] (Abb. 44 F). Die Experimente weisen auf einen direkten Zusammenhang von NMDA-Rezeptor Aktivierung und verbessertem Reparaturverhalten nach Röntgenbestrahlung hin. Zusätzlich konnte mit dem Einsatz von Ifenprodil gezeigt werden, dass vermutlich ein spezieller

²⁵⁰ Huettner und Bean 1988; Wong et al. 1986; Williams 1993; Anis et al. 1990.

²⁵¹ Legendre und Westbrook 1991; Williams 1993.

²⁵² Khelifa und Beck 1999.

²⁵³ Madabhushi et al. 2015.

²⁵⁴ Wang et al. 2014; Yoshimura et al. 2003.

NMDA-Rezeptor für die Aktivierung der Top2B verantwortlich ist. Im Folgenden wurden Immunfluoreszenzfärbungen angefertigt um die Expression der Untereinheiten der NMDA-Rezeptoren zu untersuchen. Aus Abbildung 45 geht hervor, dass Neurone die essentielle NR1-Untereinheit (UE), welche nötig ist um einen funktionalen NMDA-Rezeptor zu bilden, sowie die UE NR2A und NR2B exprimierten.

Die Immunfluoreszenzfärbungen der NMDAR-Untereinheiten in den neuronalen Stammzellen aus Abbildung 45 deckten sich mit den Beobachtungen aus der Literatur. So exprimierten die Nachfolger der embryonalen Stammzellen, besonders stark die NR2A- und kaum die NR2B-UE, während die reifen Neurone beide NR2-Untereinheiten relativ ausgeglichen exprimierten. Aus der Literatur geht hervor, dass auch Gliazellen NMDAR Untereinheiten exprimieren, wobei besonders in Astrozyten die Tri-Heteromere (GluN1+ GluN2+ GluN3) Konfiguration überrepräsentiert sein soll²⁵⁵. Es konnte repräsentativ für die Gliazellen in den Astrozyten die NR1, sowie NR2A-UE nachgewiesen werden. NMDA-Rezeptoren mit einer NR2B-UE konnten hingegen nicht nachgewiesen werden (Abb. 45).

²⁵⁵ Palygin et al. 2011; Palygin et al. 2010; Alsaad et al. 2019; Saab et al. 2016.

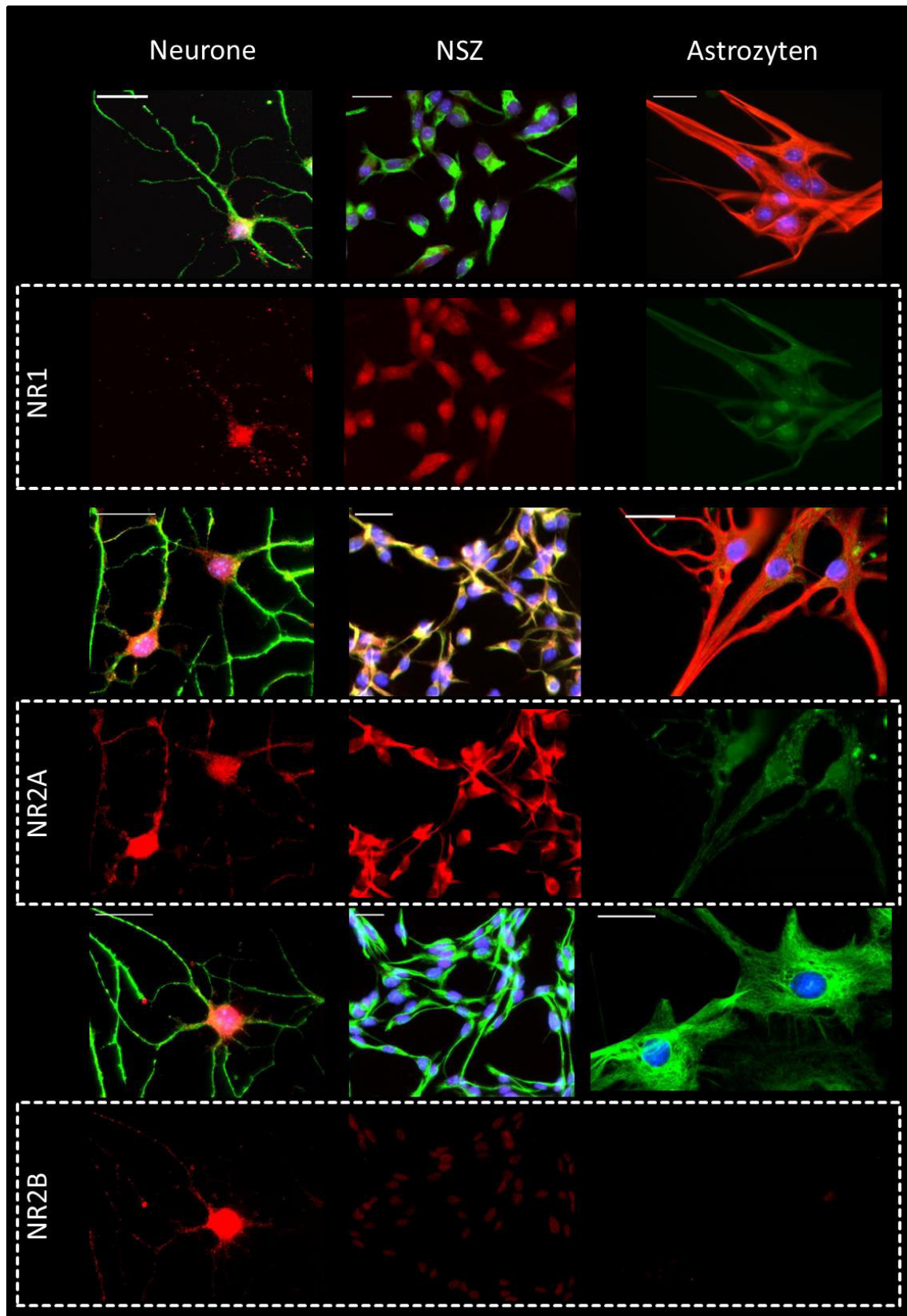


Abbildung 45: Immunfluoreszenzmarkierung der NMDA-Untereinheiten NR1, NR2A und NR2B in NSZ, Neuronen und Astrozyten.

Markiert wurde, für die Funktion essentielle Untereinheit, NR1 in Neuronen (rot), NSZ (rot) und Astrozyten (grün). Sowie die Untereinheiten NR2A, in Neuronen (rot), NSZ (rot) und Astrozyten (grün), und NR2B in allen Zelltypen (rot). Zusätzlich wurde das jeweils charakteristische Intermediärfilament markiert, für Neuronen MAP2 (grün) NSZ Nestin (grün) und Astrozyten GFAP (rot und grün). Die Zellkerne der NSZ und Deszendents fluoreszieren aufgrund der Färbung mit Hoechst33342 in Blau. Die Größe der Maßstäbe beträgt 25 μm .

Die Fluoreszenzfärbungen der Glia- und Stammzellen zeigten, dass sie NMDA-Rezeptoren exprimierten, allerdings nicht in der Vielfalt wie es bei den Neuronen der Fall war. So wiesen nur die Neurone eine deutliche Expression der NR2B-Untereinheit auf (Abb. 45). Es sollte überprüft werden, ob die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren mit der UE NR2B verantwortlich sind, für die Einleitung einer Signalkaskade, bei welcher DNS DSBs induziert werden, die wiederum hilfreich für die Reparatur von Strahlenschäden sind. Dafür wurde in Glia- und Stammzellen ebenfalls ein Glutamatimpuls über Nacht gesetzt und die Zellen daraufhin mit 500 mGy bestrahlt (Abb. 46).

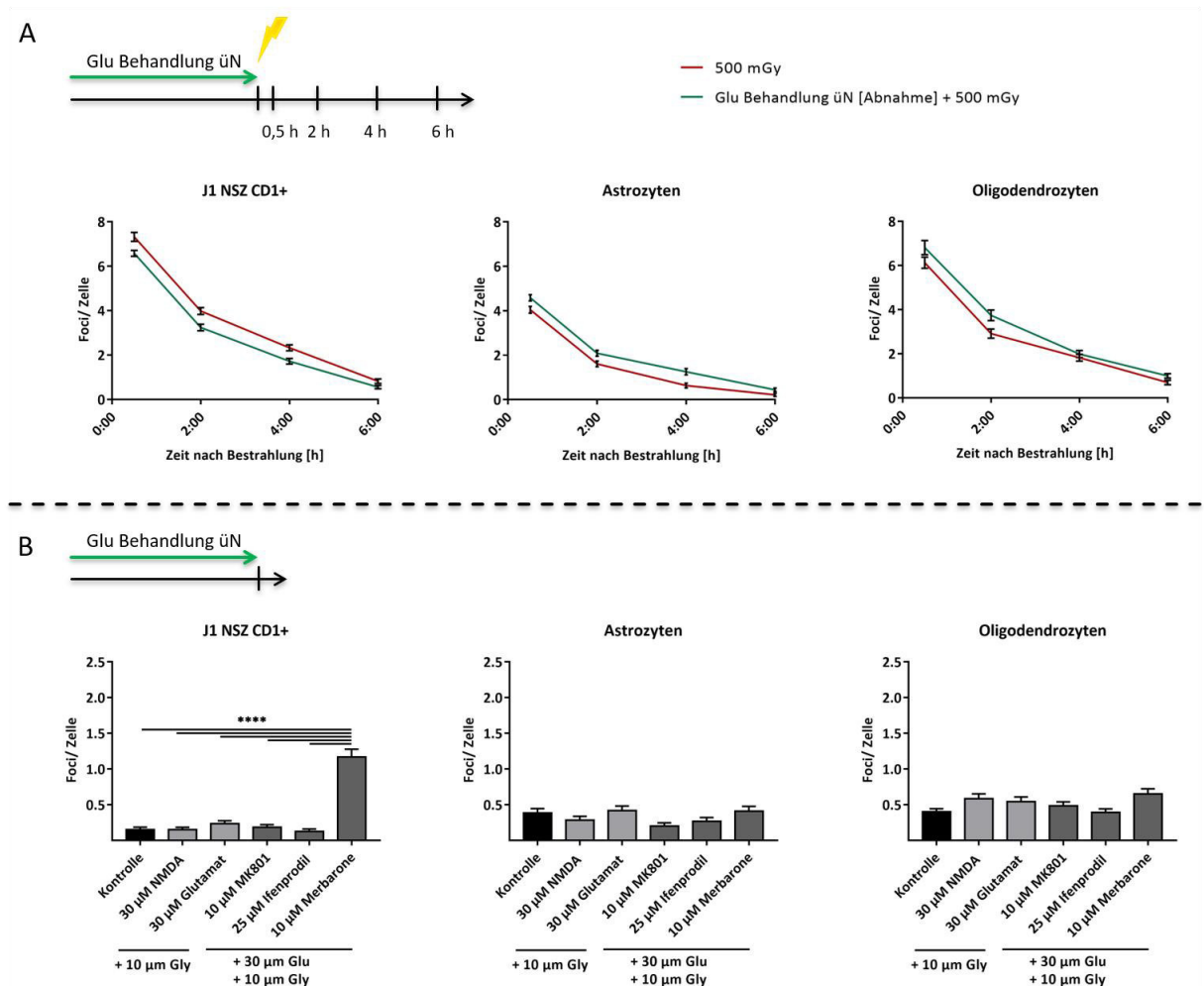


Abbildung 46: Glutamat steigerte nicht die Reparaturreffizienz von strahleninduzierten DNS DSBs in Glia- und Stammzellen.

(A) Reparaturverlauf strahleninduzierter DNS DSBs nach 500 mGy Bestrahlung (rot) und bei zu voriger Glutamatbehandlung über Nacht (grün) in NSZ und Gliazellen. Die Zellen wurden 0,5 h, 2 h, 4 h und 6 h nach Bestrahlung fixiert und die Anzahl der 53BP1-Foci bestimmt. Ausgewertet wurden pro Behandlung und Datensatz > 160 Zellen in unabhängigen Versuchen [Für Glu Behandlung üN (Abnahme) + 500 mGy: J1 NSZ n=3, Astrozyten n= 3, Oligodendrozyten n> 3, für 500 mGy: s. Abb.

42 A]. Aufgetragen ist der Mittelwert mit entsprechendem SEM. (B) Anzahl an 53BP1-Foci nach über Nacht Behandlungen mit NMDA, Glutamat, MK801, Ifenprodil und Merbarone. Ausgewertet wurden je Behandlung und Zelltyp 40 Zellen (NSZ: n=3, Astrozyten: n>3, Oligodendrozyten: n=3). Signifikanzen wurden mit dem Kruskal-Wallis Test ermittelt; $p \leq 0,0001$ (****).

Astrozyten und Oligodendrozyten die einen Glutamatimpuls über Nacht erhielten, reparierten die darauffolgenden strahleninduzierten DNS DSBs nicht effizienter als Zellen die keinen Glutamatimpuls erhalten hatten (Abb. 46 A). Ebenso führte ein moderat gesetzter Glutamatimpuls zu keiner Induktion von 53BP1-Foci, im Gegensatz zu den Neuronen (vgl. Abb. 44 E). Aus Abbildung 46 B ist ersichtlich, dass weder NMDA noch Glutamat in den Gliazellen oder Stammzellen eine Induktion von DNS DSBs auslösen konnte. Auch die glutamatergen Antagonisten MK801 und Ifenprodil zeigten keinen Effekt. Einzig Merbarone, der Inhibitor der Topoisomerase II-beta löste in den neuronalen Stammzellen eine erhöhte Foci Induktion aus [Kontrolle= $0,15 \pm 0,04$ Foci/ Zelle, 10 μ M Merbarone (+Glu/ Gly)= $1,2 \pm 0,1$ Foci/ Zelle, $p \leq 0,0001$ (****)]. Dieser Effekt beruhte auf der Eigenschaft von Merbarone in mitotischen Zellen durch Induktion von DNS DSBs den Zellzyklus zu verlangsamen und die Zellen in G2 Arrest zu halten²⁵⁶.

Die Ergebnisse deuteten auf einen exklusiven Signalweg hin, welcher über die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren mit der spezifischen UE NR2B eingeleitet wurde, durch die Aktivierung der Top2B zu einer Induktion von DNS DSBs führte, dadurch die Transkription von Genen ermöglicht wurde, die notwendig für eine effiziente Reparatur von Strahlenschäden in Neuronen waren.

5.3.5 Protektiver Effekt Glutamats auf neuronale Spontanaktivität, welche durch Niedrigdosisbestrahlung reduziert wurde

Aus einer vorausgegangenen Arbeit (Dr. Kerstin Rau²⁵⁷) war bekannt, dass Niedrigdosisstrahlung neben der Induktion von erheblichen Schäden in der DNS auch zu einer negativen Beeinträchtigung des funktionalen, neuronalen Netzwerkes führen kann. Daher sollte analysiert werden wie stark sich der Effekt der Niedrigdosisstrahlung auf die Spontanaktivität der Neuronenkultur auswirken würde und ob eine zu vorige Glutamatbehandlung den Negativeffekt abschwächen oder gar relativeren könnte.

Mit Hilfe des Mikroelektrodenarrays (MEA) sollte die Spontanaktivität des neuronalen Netzwerkes, welches sich durch die Differenzierung der Stammzellen zu Neuronen entwickelt hatte, aufgezeichnet und bestimmt werden. Unter Kapitel 5.2.10 ist die Funktionsweise des MEA-Systems und die Kultivierung der Neuronenkulturen auf MEA-Chips beschrieben. Die Differenzierung der neuronalen Stammzellen umfasste einen Zeitraum von 13 Tagen, wobei an Tag 9 getestet wurde, ob die Kulturen Spontanaktivität zeigten. Kulturen die ein homogenes Wachstumsbild über die

²⁵⁶ Wang et al. 2007; Fortune und Osherooff 1998.

²⁵⁷ Kerstin Rau 2018.

Elektronen zeigten (Abb. 47) und Aktivitäten aufwiesen, deren Amplituden größer als 20 μV waren, wurden an Tag 10 mit oder ohne vorheriger Glutamatbehandlung, mit 500 mGy oder sham bestrahlt. An Tag 11 und 13 wurde in allen Gruppen die Veränderung der Spontanaktivität überprüft. Abbildung 47 zeigt den Differenzierungsverlauf von unterschiedlichen Neuronenkulturen auf MEA-Chips.

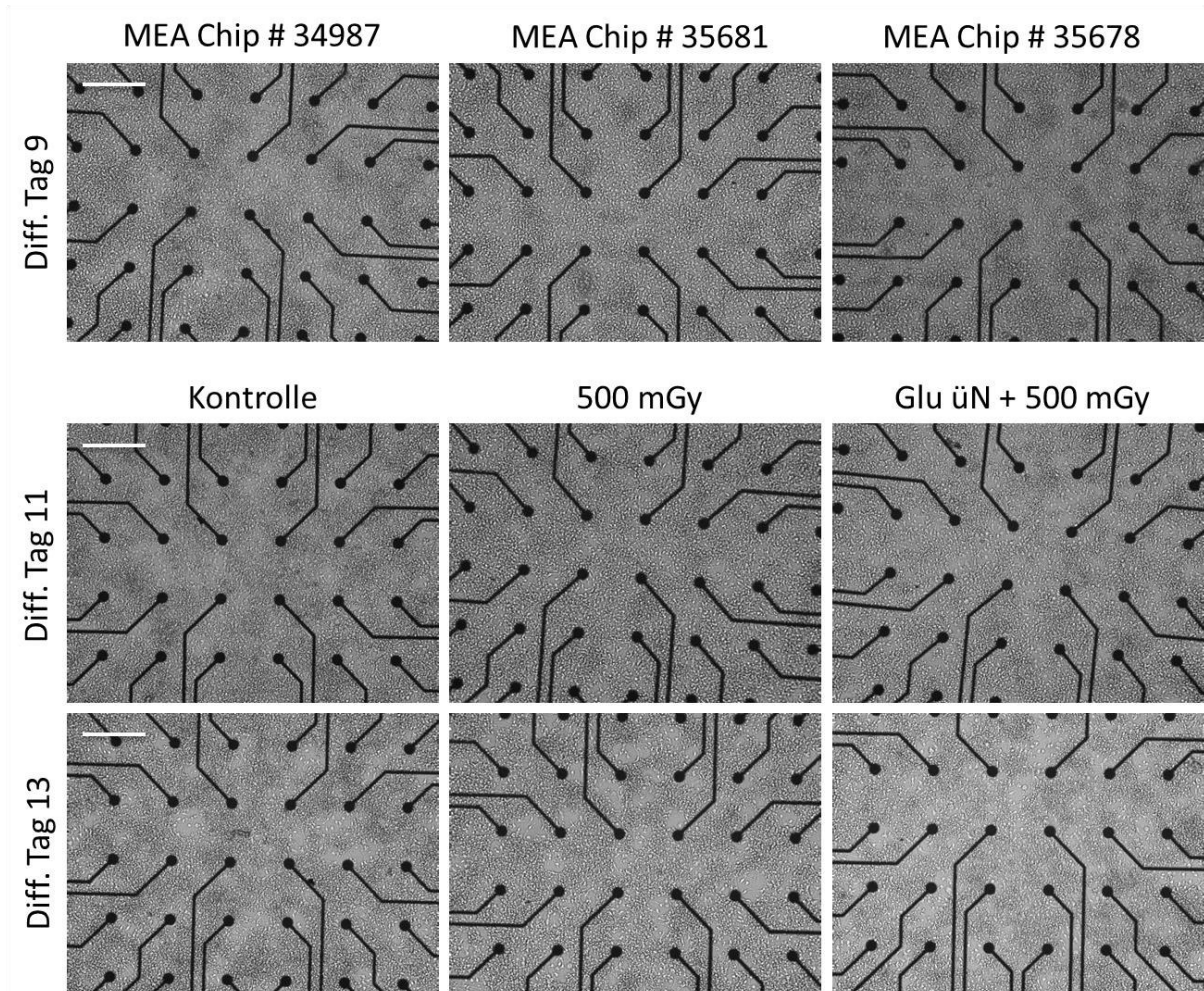


Abbildung 47: Differenzierung von Neuronenkulturen auf MEA-Chips.

Repräsentative Durchlichtmikroskopiebilder adhärent wachsender Neuronenkulturen auf MEA-Chips an den Differenzierungstagen 9, 11 und 13. An Tag 9 wurden sie in die Gruppen: Kontrolle, Glutamat behandelt und bestrahlt und ausschließlich 500 mGy bestrahlt eingeteilt. Die Größe der Maßstäbe beträgt 50 μm .

Die Differenzierung der Neuronen auf MEA-Chips führte nach 9 Tagen zu einer Bildung eines neuronalen Netzwerkes. Ein funktionales Netzwerk verfügt über die Fähigkeit Spontanaktivität auszubilden, wobei Spontanaktivität sich durch die Veränderung des Membranpotentials äußert und so extrazellulär abgeleitet werden kann²⁵⁸. Nur Neurone die über ein synaptisches System und eine entsprechende Konnektivität verfügen weisen Spontanaktivität auf. Es wurden nur

²⁵⁸ van Pelt et al. 2004; Chiappalone et al. 2007; Buzsáki und Draguhn 2004.

Neuronenkulturen auf ihre Spontanaktivität untersucht, die über die gesamte Differenzierungszeit konfluent und stabil wuchsen und keine apoptotischen Merkmale, wie abgerundete und lose Zellkörper, aufwiesen. Gemessen wurde die Spontanaktivität wie unter Kapitel 5.2.10 beschrieben, für jede der 59 Elektroden einzeln, unter Berücksichtigung eines angelegten Schwellenwertes, der auf der Höhe der vierfachen Standardabweichung des Rauschens lag. Jedes Ereignis welches den Schwellenwert überschritt, wurde als Spontanaktivität (Spike) gewertet. In Abbildung 48 sind zur vereinfachten Darstellung der Spontanaktivität, repräsentative Rasterplots der drei Versuchsgruppen abgebildet. Diese vermitteln nicht nur einen Eindruck über die Stärke der Aktivität in der Neuronenkultur, sondern ebenso über die Synchronität der detektierten Ereignisse.

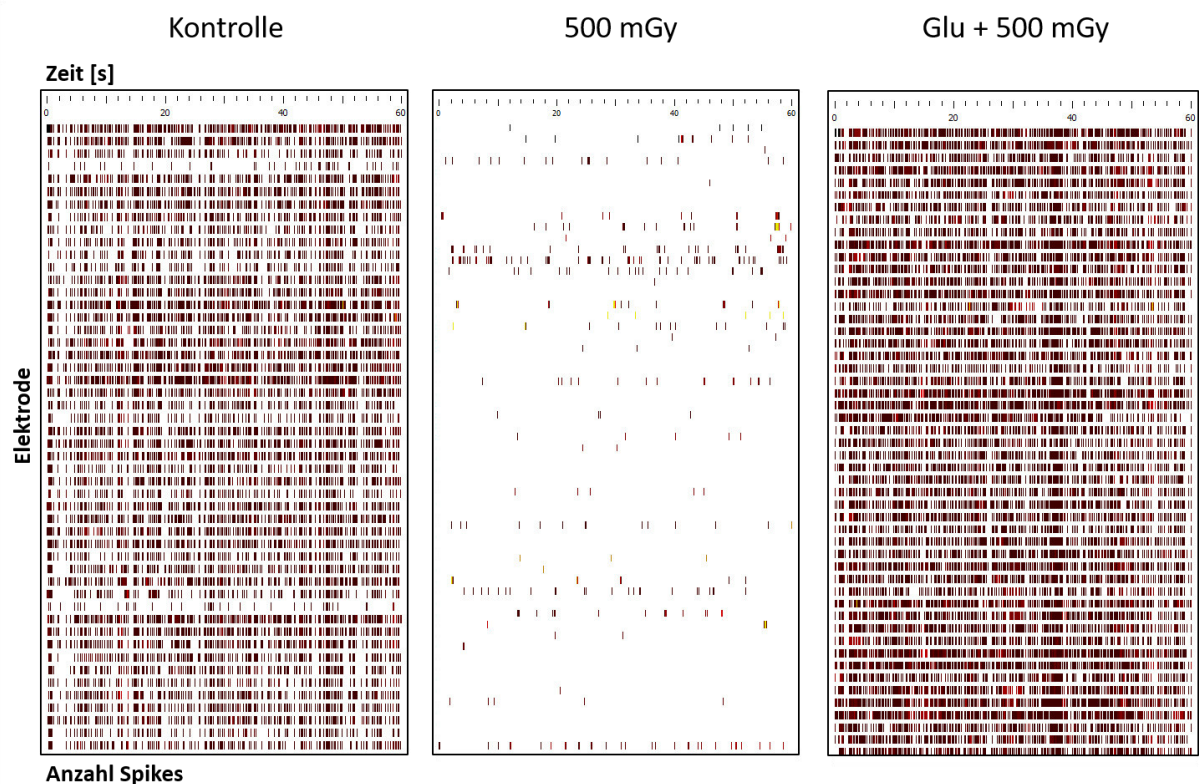


Abbildung 48: Repräsentative Rasterplots zeigen Aktivitätsminderung nach Bestrahlung und protektiven Effekt durch Glutamatbehandlung.

Dargestellt sind die in 59 Elektroden ermittelten Ereignisse (Spikes) aufgetragen gegen die Zeit (60 s). Jedes Ereignis welches den Schwellenwert (4-fache SD des Rauschens) überschritt, wurde als Spontanaktivität (Spike) gewertet.

Aus den Rasterplots konnte eine regelmäßige, teils synchrone Aktivität der Neuronenkulturen aus der Kontroll- und der mit Glu + 500 mGy bestrahlten-Behandlungsgruppe beobachtet werden (Abb. 48). Die ausschließlich bestrahlte Gruppe hingegen wies ein erhebliches Defizit in der Generierung von Spontanaktivität bei fast allen Elektroden auf. Eine Synchronität der Aktivitäten war aufgrund der geringen Anzahl an Ereignissen nicht feststellbar.

Die Rasterplots verweisen auf zwei Effekte. Zum einen schien die Bestrahlung mit 500 mGy an Differenzierungstag 10 die Spontanaktivität der Neuronenkultur an Tag 13 erheblich zu vermindern und zum anderen wirkte die Behandlung mit Glutamat an Tag 9 der strahleninduzierten Verringerung der Aktivität entgegen. Für eine Quantifizierung des, durch die Bestrahlung und Glutamat induzierten, Effektes auf die Neuronenkulturen wurde die Anzahl der aktivierten Kanäle, die Anzahl der Spikes sowie deren Amplituden innerhalb von 100 Sekunden an den Differenzierungstagen 9, 11 und 13 gemessen (Abb. 49).

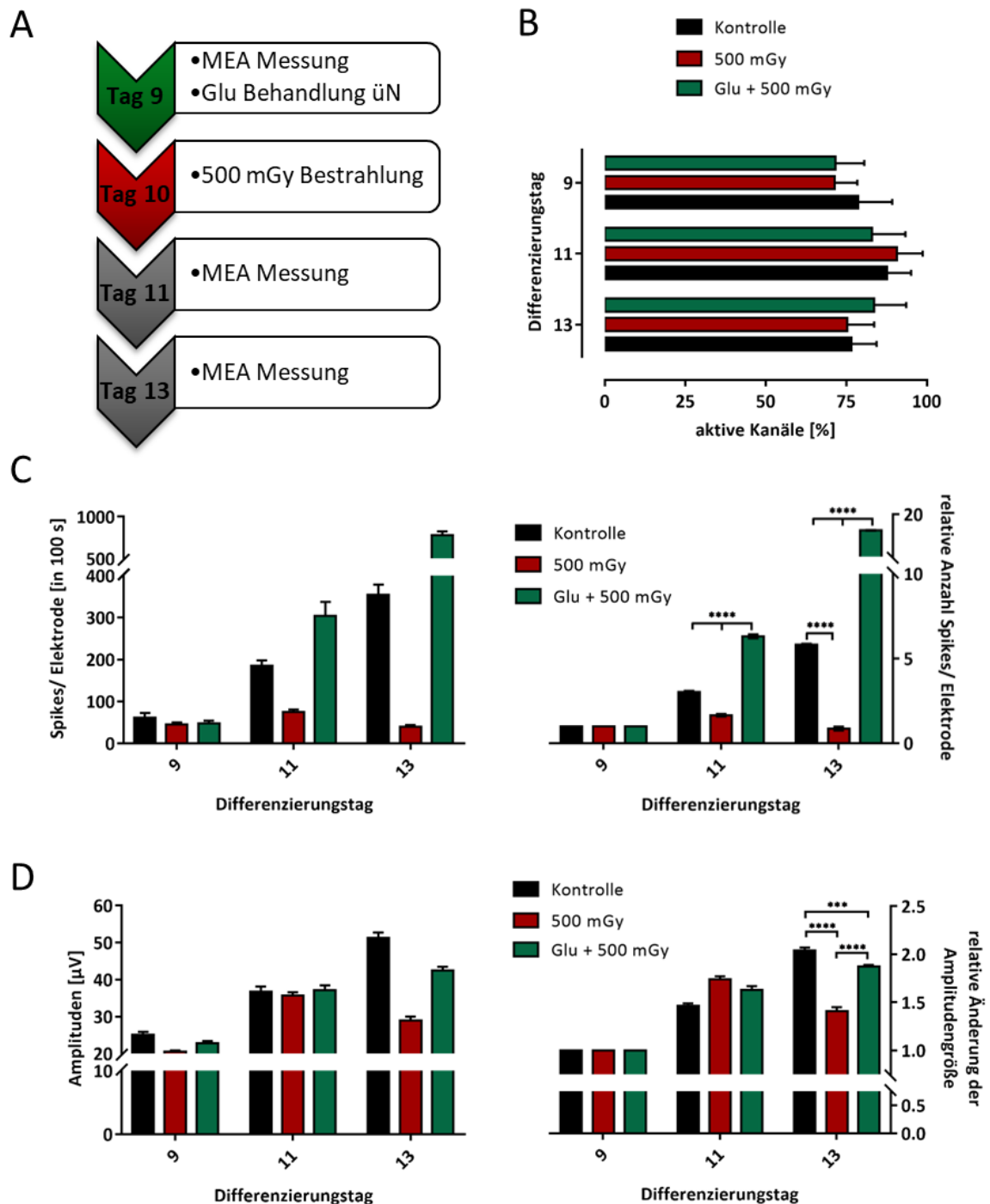


Abbildung 49: Protektiver Effekt durch Glutamatbehandlung auf Spontanaktivität und Amplitudengröße in Neuronenkulturen.

(A) Experimentierschema. Neurone wurden an Differenzierungstag 9 gemessen und ein Teil davon mit Glutamat behandelt. An Tag 10 wurde das alte Medium durch frisches Medium, ohne Agenzien ersetzt und die Zellen sham bzw. mit 500 mGy bestrahlt. An Differenzierungstag 11 und 13 erfolgten weitere Messungen. (B) Durchschnittliche Anzahl der Elektroden, die Spontanaktivität aufzeichnen konnten. (C) Durchschnittliche Anzahl an aufgezeichneten Spikes innerhalb einer Messung (100 s) (links) und normiert auf die durchschnittliche Anzahl an Spikes an Differenzierungstag 9 (rechts). (D) Durchschnittlichen Größe der aufgezeichneten Amplituden in μV (links) und normiert auf die Amplitudengrößen an Differenzierungstag 9 (rechts). Ausgewertet wurden insgesamt für die Behandlungsgruppen: Kontrolle $n = 7$, 500 mGy $n = 6$, Glu + 500 mGy $n = 5$ (Anzahl der MEA-Chips aus drei voneinander unabhängigen Versuchsansätzen). Insgesamt wurden 85 %

der Elektroden ausgewertet. Signifikanzen wurden durch den Kruskal-Wallis Test ermittelt; $p < 0,0002$ (***), $p \leq 0,0001$ (****).

Abbildung 49 A zeigt das Experimentierschema für die Messung der Spontanaktivität der reinen Neuronenkulturen. Die Neuronen wurden an Differenzierungstag 9 gemessen, ein Teil von ihnen daraufhin mit Glutamat behandelt und an Tag 10 wurden alle MEA-Chips sham bzw. mit 500 mGy bestrahlt. Weitere Messungen der Spontanaktivität folgten an den Differenzierungstagen 11 und 13. Aus Abbildung 49 B ist ersichtlich, dass es keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der aktivierten Kanäle gab, weder über die Differenzierungszeit hinaus noch unter den Behandlungsgruppen. Die Anzahl der aufgezeichneten Spontanaktivitäten (Spikes) hingegen stieg in allen Behandlungsgruppen von Differenzierungstag 9 zu 11 an. Allerdings war der Anstieg in der bestrahlten Probe minimal und sank sogar am Differenzierungstag 13 (500 mGy: Tag 9 $\bar{x} = 45,4 \pm 4,8$ Spikes/ 100 s, Tag 11 $\bar{x} = 74,62 \pm 6$ Spikes/ 100 s, Tag 13 $\bar{x} = 39,2 \pm 4,5$ Spikes/ 100 s). Dagegen führte eine vor der Bestrahlung durchgeführte Glutamatbehandlung zu einem kontinuierlich über die Differenzierungszeit verlaufenden Anstieg der Aktivität (Glu+ 500 mGy: Tag 9 $\bar{x} = 48,2 \pm 6$ Spikes/ 100 s, Tag 11 $\bar{x} = 304,3 \pm 34$ Spikes/ 100 s, Tag 13 $\bar{x} = 781,6 \pm 46$ Spikes/ 100 s) (Abb. 49 C links).

Da sich die Höhe der Spontanaktivitäten der Neuronenkulturen an Tag 9 unter den Behandlungsgruppen unterschieden (Tag 9: Kontrolle $\bar{x} = 61,2 \pm 11$ Spikes/ 100 s, 500 mGy $\bar{x} = \text{s.o.}$, Glu+ 500 mGy $\bar{x} = \text{s.o.}$), wurde die Anzahl der Spikes, welche an Tag 11 und 13 gemessen wurden auf die jeweilige Spikeanzahl des 9. Differenzierungstages normiert (Abb. 49 C rechts). Die Neuronenkultur die bestrahlt wurde, wies signifikant weniger Spikes an Differenzierungstag 13 auf als die Kontrollgruppe [(Kontrolle relative Änderung $\bar{x} = 5,8 \pm 0,07$, 500 mGy relative Änderung $\bar{x} = 0,86 \pm 0,1$, $p \leq 0,0001$ (****)]. Die Bestrahlung verringerte die Aktivität der Neurone nachhaltig (Tag 13: Kontrolle $\bar{x} = 355 \pm 24$ Spikes/ 100 s, 500 mGy $\bar{x} = 39,2 \pm 4,5$ Spikes/ 100 s). Interessanterweise konnte der Effekt der Bestrahlung durch eine zu vorige Glutamatbehandlung verhindert werden (Tag 13: Glu+ 500 mGy $\bar{x} = 781,6 \pm 46$ Spikes/ 100 s). Die Anzahl der gemessenen Spikes der glutamatbehandelten Gruppe, war signifikant höher als die der bestrahlten an Tag 13 [relative Änderung $\bar{x} = 16,2 \pm 0,06$ Spikes/ 100 s $p \leq 0,0001$ (****)]. Auch die Größe der Amplitude der gemessenen Spikes wurde durch die Bestrahlung erheblich verringert (Tag 13: 500 mGy $\bar{x} = 28,9 \pm 1$ μV , Kontrolle $\bar{x} = 51,2 \pm 1,5$ μV). Gleichmaßen konnte eine zu vorige Behandlung mit Glutamat diesen Effekt verhindern (Glu+ 500 mGy $\bar{x} = 42,5 \pm 0,9$ μV) (Abb. 49 D links). Die gemessenen Amplitudengrößen der Differenzierungstage 11 und 13 wurden wie die Anzahl der Spontanaktivitäten auf den Differenzierungstag 9 normiert um die Vergleichbarkeit zu erhöhen. Die Amplitudengröße der bestrahlten Neurone war im Vergleich zu den Kontrollen und den mit Glutamatbehandelten, bestrahlten Proben, signifikant verringert am Differenzierungstag 13

[Kontrolle relative Änderung $\emptyset = 2,04 \pm 0,03$, 500 mGy relative Änderung $\emptyset = -1,4 \pm 0,04$, Glu+ 500 mGy relative Änderung $\emptyset = 1,87 \pm 0,02$, $p \leq 0,0001$ (****)] (Abb. 49 D rechts).

Die Experimente unterstützten die Hypothese, dass Glutamat einen schützenden Effekt auf die Netzwerkaktivität hatte, die durch Bestrahlung verringert wurde. Um ausschließen zu können, dass die verringerte Spontanaktivität der 500 mGy bestrahlten Proben auf Apoptose zurückzuführen war, wurden MTT-Assays, nach dem gleichen Experimentierschema und Zeitplan wie die Spontanaktivitäts-Messungen am MEA-System, durchgeführt (Abb. 50).

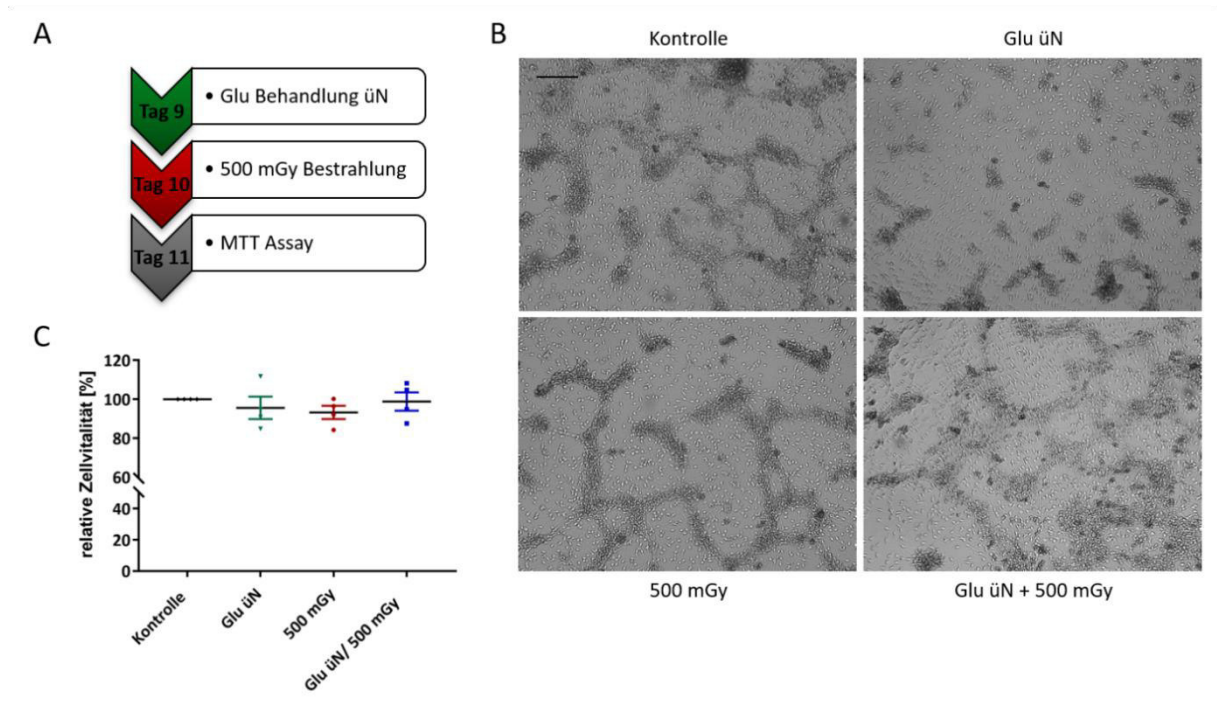


Abbildung 50: Keine veränderte Zellvitalität der Neuronen nach Glutamatbehandlung, und, oder 500 mGy Bestrahlung.

(A) Experimentierschema der MTT-Assays. Ein Teil der Neurone wurde an Differenzierungstag 9 mit Glutamat behandelt, an Tag 10 wurden alle sham bzw. mit 500 mGy bestrahlt und an Tag 11 die MTT Assays durchgeführt. (B) Repräsentative Durchlichtmikroskopiebilder wurden an Differenzierungstag 10 aufgenommen. Die Größe des Maßstabsbalkens entspricht 100 μ m. (C) Relative Zellvitalität der Neuronen. Aufgetragen ist jeweils der Mittelwert mit SEM. Es konnten keine signifikanten Unterschiede mit dem Einstichproben t-Test ermittelt werden; $p > 0,1234$ (ns).

Die Neuronenkulturen wurden entweder an Differenzierungstag 9 mit Glutamat behandelt und an Tag 10 mit 500 mGy bzw. sham bestrahlt oder ausschließlich an Tag 10 sham bzw. 500 mGy bestrahlt und die relative Zellvitalität an Tag 11 gemessen (Abb. 50 A). Die Zelldichte wurde an Tag 10 optisch mit dem Durchlichtmikroskop JuLI™ überprüft. Die Zellen aus allen Behandlungsgruppen unterschieden sich in ihrer Konfluenz und Morphologie am 10. Differenzierungstag nicht (Abb. 50 B). Am 11. Differenzierungstag wurde die Zellvitalität überprüft. Es konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Abb. 50 C). Die Ergebnisse des MTT-Tests zeigten, dass keine Apoptose oder Nekrose für die Verringerung der Spontanaktivität in den Neuronenkulturen verantwortlich war. Die Hypothese, dass Niedrigdosisröntgenstrahlung zu einer Beeinträchtigung der

Funktionalität des neuronalen Netzwerkes führte und dass Glutamat protektiv gegen diese Schädigungen wirkte, erhartete sich damit.

5.4 Diskussion Kap II

Im zweiten Kapitel dieser Arbeit sollten die kurzfristigen Effekte von Niedrigdosisbestrahlung auf das neuronale System untersucht werden. Die murine *in vitro* Zelllinie J1 diente dabei als Modellsystem für ein neuronales Netzwerk. Der Minimalismus dieser Zelllinie ermöglichte es, die Hauptzelltypen des neuronalen Netzwerkes, neuronale Stammzellen, Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten unabhängig voneinander auf ihre Strahlensensitivität zu analysieren. Dafür wurden in zehntägigen Differenzierungsprozessen aus den murinen Stammzellen homogene Neuronen-, Astrozyten- und Oligodendrozytenkulturen generiert (Abb. 35, 36, 37, 39). Im besonderen Fokus stand die Zusammensetzung der Neuronenkultur. Durch Immunfluoreszenzfärbungen konnte gezeigt werden, dass diese sowohl glutamaterge als auch GABAerge Rezeptoren sowie PSD95 und Synaptophysin exprimieren. Damit erfüllte die Neuronenkultur die nötigen Voraussetzungen, um ein erregbares Netzwerk zu bilden, welches auf äußere Signale sensitiv reagieren konnte.

5.4.1 Verzögerte Reparatur von strahleninduzierten DNS Doppelstrangbrüchen in Neuronen

Die Bestrahlung mit 500 mGy Röntgenstrahlung löste sowohl in den Stammzellen als auch in den Deszendenten die Induktion von DNS Doppelstrangbrüchen (DSBs) aus, welche über die Zeit repariert wurden. Der Reparaturverlauf wurde über die Abnahme von 53BP1-Foci verfolgt. 53BP1 ist ein entscheidendes Reparaturprotein der nicht-homologen Endverknüpfung (NHEJ). Durch dessen schnelle Rekrutierung an Bruchenden von DNS DSBs, schützt es die Enden vor der Resektionsmaschinerie der homologen Rekombination (HR) und trägt damit dazu bei, den Reparaturweg NHEJ über die HR zu favorisieren²⁵⁹. 53BP1 bildet durch die verstärkte Rekrutierung weiterer 53BP1-Proteine an das Bruchende einen Focus, welcher durch Immunfluoreszenzfärbungen sichtbar gemacht werden kann. Dabei entspricht ein Focus einem DNS DSB²⁶⁰. Die Ergebnisse der Niedrigdosisbestrahlung zeigten signifikante Diskrepanzen im Reparaturverlauf der Neuronen im Vergleich zu den übrigen Zelltypen. Interessanterweise reparierten sowohl die Stammzellen als auch die Astrozyten und Oligodendrozyten 50 % der strahleninduzierten DNS DSBs innerhalb von ca. 2 h (s. Abb. 42 C - E). Die Neuronen benötigten hingegen doppelt so viel Zeit, um 50 % der strahleninduzierten DNS DSBs zu reparieren. Nach 6 h verblieben immer noch 33 % der DNS DSBs in der homogenen Neuronenkultur (s. Abb. 42 B). Dass Neurone strahleninduzierte Schäden verzögert reparieren, konnte schon zuvor beobachtet werden. So zeigten Gobbel und Kollegen 1998, dass kortikale Neurone aus der Ratte nach Bestrahlung mit einer Dosis von 32 Gy im Vergleich zu

²⁵⁹ Bunting et al. 2010; Bugreev et al. 2006; Bouwman et al. 2010.

²⁶⁰ Anderson et al. 2001.

Astrozyten eine stark verlangsamte DNS DSB-Reparatur aufweisen²⁶¹. Zudem konnte festgestellt werden, dass die Effizienz des NHEJ-Reparaturweges mit steigendem Alter der Neurone sinkt. So reparieren Neurone, die aus jungen Ratten (0 - 4 Tage) entnommen wurden, DNS DSBs effizienter als Neurone aus adulten Tieren (3 – 6 Monate) und erheblich effizienter als Neurone aus alten Tieren (2 - 3 Jahre)²⁶². Postmitotische Zellen können prinzipiell massivere DNS-Schäden besser tolerieren, wenn diese Schäden an Stellen des Genoms auftreten, die nicht mehr transkribiert werden²⁶³. Andererseits können Akkumulationen von DNS-Schäden weitreichende Folgen für die Funktion der Zelle haben. Besonders adulte Neurone, die eine hohe Metabolismusaktivität aufweisen²⁶⁴, einen Großteil ihres Genoms transkribieren²⁶⁵ und ein Leben lang funktional sein müssen²⁶⁶, werden durch Akkumulationen von DNS Schäden gefährdet. Ein Zusammenhang zwischen DNS-Schäden in Neuronen und der Entwicklung neurodegenerativer Krankheiten konnte in den letzten Jahren hergestellt werden²⁶⁷.

5.4.2 Die Aktivierung des glutamatergen Systems induziert DNS DSBs und verbessert simultan die Reparatur strahleninduzierter DNS DSBs in Neuronen

Die Experimente deuten auf einen exklusiven Signalweg für die Reparatur von DNS DSBs in Neuronen hin. Um diesen Signalweg zu aktivieren, wurde der hauptexzitatorische Neurotransmitter im ZNS, Glutamat, gewählt²⁶⁸. Glutamat spielt für das neuronale Zellüberleben eine entscheidende Rolle²⁶⁹ und steht im Verdacht, die DNS DSB Reparatur zu stimulieren²⁷⁰. Tatsächlich führte die Behandlung der homogenen Neuronenkultur mit Glutamat zu einer signifikant verbesserten Reparatur der strahleninduzierten DNS DSBs. Dieser Effekt trat nur nach einer Impulsbehandlung über Nacht auf. Eine dauerhafte Behandlung mit Glutamat hatte zur Folge, dass neben den strahleninduzierten DNS DSBs zusätzliche Brüche generiert wurden (s. Abb. 44 C). Die Behandlung der Neurone mit Glutamat ohne anschließende Röntgenbestrahlung führte zur Aktivierung von Signalkaskaden, die die Erzeugung von DNS DSBs bewirkten. Dass die Aktivierung des glutamatergen Systems DNS DSBs auslösen kann, wurde bereits in vorangegangenen *in vitro* und *in vivo* Studien beschrieben²⁷¹. Der dabei

²⁶¹ Gobbel et al. 1998.

²⁶² Vyjayanti und Rao 2006; Sharma 2007.

²⁶³ Tichy und Stambrook 2008; Nospikel 2007.

²⁶⁴ Mink et al. 1981; Magistretti und Allaman 2015.

²⁶⁵ Gallegos et al. 2018; Yap und Greenberg 2018.

²⁶⁶ Bandeira et al. 2009.

²⁶⁷ Shanbhag et al. 2019; Merlo et al. 2016.

²⁶⁸ Hertz 2006.

²⁶⁹ Jansson und Åkerman 2014; Akaike 1994; Erecinska 1990; Brazel et al. 2005.

²⁷⁰ Yang et al. 2011.

²⁷¹ Crowe et al. 2006; Madabhushi et al. 2015; Suberbielle et al. 2013.

entscheidende Faktor ist das Enzym Topoisomerase II-beta (Top2B), welches hauptsächlich in postmitotischen Zellen exprimiert wird. Top2B induziert vorübergehende DNS DSBs, um den topologischen Stress, der durch das Aufwinden der DNS für die Transkriptionsmaschinerie entsteht, zu minimieren²⁷². Eine weitere Funktion der Top2B ist das Setzen von DNS DSBs in Promotorregionen von so genannten *immediate early genes* (IEGs), die daraufhin transkribiert werden. Madabhushi und Kollegen konnten 2015 zeigen, dass durch die Aktivierung des glutamatergen Systems Top2B aktiviert wird und die Transkription der IEGs steigt²⁷³. IEGs sind essentiell für die neuronale Funktionalität, weshalb eine beeinträchtigte Expression zu schwerwiegenden kognitiven Dysfunktionen führen kann²⁷⁴. Zudem gibt es Anhaltspunkte, dass Top2B, durch die Stabilisierung von NHEJ-Reparaturproteinen direkt in der Reparatur von ROS induzierten DNS DSBs involviert ist²⁷⁵. Tatsächlich verhinderte die Behandlung mit dem Top2B-Inhibitor Merbarone die Glutamat-medierte Induktion von DNS DSBs. Interessanterweise wurde die Induktion von DNS DSBs ebenso inhibiert, wenn die Neuronenkulturen mit dem NMDAR-Inhibitor MK801²⁷⁶ bzw. dem spezifischen NR1/NR2B-Inhibitor Ifenprodil²⁷⁷ behandelt wurden (s. Abb. 44 E). Die Behandlung mit dem Agonisten NMDA initiierte hingegen die Induktion von DNS DSBs. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Induktion von DNS DSBs über die Aktivierung der NMDA-Rezeptoren ausgelöst wird, genauer gesagt über die Aktivierung der NMDA-Rezeptoren mit der Untereinheit NR2B. Unterstützend zeigten Immunfluoreszenzfärbungen die starke Expression der NR1, NR2 und NR2B Untereinheiten in den homogenen Neuronenkulturen (s. Abb. 45).

NMDA-Rezeptoren können aus verschiedenen Untereinheiten (UEs) aufgebaut sein, wobei die NR1-UE essentiell für einen funktionierenden Rezeptor ist²⁷⁸. Die NR2B-UE soll insbesondere in den extrasynaptischen NMDA-Rezeptoren vorkommen und mit der Einleitung des programmierten Zelltodes im Zusammenhang stehen, während synaptische NMDA-Rezeptoren, bei denen es sich hauptsächlich um Di-Heteromere aus NR1-UEs und NR2A-UEs handelt, die Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB (*engl. cAMP response element-binding protein*) und folglich pro-Überlebens Signalkaskaden begünstigen sollen²⁷⁹. Allerdings ist die Aussage, dass alle extrasynaptischen NMDA-Rezeptoren pro-apoptotisch und alle synaptischen NMDA-Rezeptoren anti-

²⁷² Champoux 2001; Wang 1998.

²⁷³ Madabhushi et al. 2015.

²⁷⁴ Ferguson et al. 2006; Rosi et al. 2008; Szyndler et al. 2013; Wang et al. 2014; Yoshimura et al. 2003.

²⁷⁵ Mandraju et al. 2011.

²⁷⁶ Wong et al. 1986.

²⁷⁷ Legendre und Westbrook 1991.

²⁷⁸ Vyklicky et al. 2014.

²⁷⁹ Léveillé et al. 2008; Hardingham et al. 2002; Gladding und Raymond 2011.

apoptotisch wirken, stark simplifiziert und überholt²⁸⁰. So wurde ebenso gezeigt, dass die Inhibition der NR2B-UE durch Ifenprodil zu einer verminderten Überlebensrate bis hin zum Zelltod von Neuronen führen kann²⁸¹. Zudem ist das Vorkommen und der Aufbau von NMDA-Rezeptoren in Neuronen weitaus komplexer und diverser, so gibt es neben diheteromeren NMDA-Rezeptoren auch triheteromere NMDA-Rezeptoren, die aus zwei Kopien der essentiellen NR1-UE und je einer Kopie der Untereinheiten NR2A und NR2B bestehen²⁸². So ist die NMDAR Zusammensetzung während der Entwicklung vom embryonalen zum adulten Gehirn extrem variabel. Während im embryonalen Gehirn nur NMDA-Rezeptoren mit den Untereinheiten NR2B und NR2D gebildet werden, kommt es im frühen postnatalen Gehirn zu einer Umwälzung, woraufhin die Expression der NR2A-UE dominiert. Im adulten Gehirn und dort besonders in den höheren Gehirnstrukturen wie dem Hippocampus, ist die Expression der Untereinheiten NR2B und NR2A ausgeglichen. Dies unterstreicht die Bedeutsamkeit der NMDA-Rezeptoren für die synaptische Plastizität²⁸³.

Tatsächlich bewirkte die Inhibition der NMDA-Rezeptoren mit MK801 eine Aufhebung der verbesserten Reparatur von strahleninduzierten DNS DSBs in den Neuronenkulturen (s. Abb. 44 F). Die Ergebnisse deuten auf einen NMDAR-medierten Signalweg hin, bei welchem das Enzym Top2B aktiviert wird, welches gezielt DNS DSBs setzt, um die Transkription von Überlebensgenen zu ermöglichen, die wiederum essentiell für die effektive Reparatur von strahleninduzierten DNS DSBs sind.

5.4.3 NMDAR-mediierter Signalweg führt zur Verbesserung der Reparatur strahleninduzierter DNS DSBs - einzigartig in Neuronen

Die Lokalisation und die Untereinheiten-Zusammensetzung der NMDA-Rezeptoren bestimmt, welche zellulären Signalkaskaden durch die Rezeptoraktivierung initiiert werden. Die strukturelle Vielfältigkeit der in Neuronen gefundenen NMDA-Rezeptoren spiegelt daher deren enorme Bedeutung für die Funktionalität von Neuronen wider. NMDA-Rezeptoren werden allerdings ebenso von Glia- und Stammzellen exprimiert. So konnten in dieser Arbeit in Stamm- und Gliazellen die essentielle NMDAR Untereinheit NR1 sowie die Untereinheit NR2A nachgewiesen werden (s. Abb. 45). Aus der Literatur geht hervor, dass NMDA-Rezeptoren stark im sich entwickelnden, als auch im adulten Gehirn exprimiert werden²⁸⁴. Allerdings werden die NMDA-Rezeptoren erst später funktional. Dies bedeutet, dass messbare Ca^{2+} -Ströme und daraus resultierende

²⁸⁰ Sattler et al. 2000; Lopez de Armentia und Sah 2003; Petralia et al. 2010.

²⁸¹ Katsuki et al. 2003; Takadera et al. 2004.

²⁸² Rauner und Köhr 2010; Al-Hallaq et al. 2007.

²⁸³ Monyer et al. 1994; Watanabe et al. 1992; Akazawa et al. 1994.

²⁸⁴ LoTurco et al. 1991; Monyer et al. 1992; Monyer et al. 1994; Buller et al. 1994; Henson et al. 2008; Bendel et al. 2005.

Membrandepolarisierungen erst auftreten, wenn die Stammzellen zu jungen, migrierenden Neuronen differenziert sind²⁸⁵. Ca^{2+} -getragene Signalwege werden in Stammzellen von calciumpermeablen AMPA-Rezeptoren realisiert²⁸⁶. Das besondere an diesen AMPA-Rezeptoren ist ihre nicht Q/R-editierte Untereinheit GluA2. Durch die fehlende Editierung sind AMPA-Rezeptoren, die die Untereinheit GluA2 tragen, calciumpermabel. Erst im Laufe der Entwicklung erfolgt die Q/R-Editierung, wodurch die AMPA-Rezeptoren calciumimpermeabel werden²⁸⁷. Der Ca^{2+} -Einstrom erfolgt dann hauptsächlich über die NMDA-Rezeptoren²⁸⁸.

Gliazellen exprimieren hauptsächlich den ionotropen Glutamaterezeptor AMPA²⁸⁹. Dabei bestehen gliogene AMPA-Rezeptoren hauptsächlich aus den Untereinheiten GluR1, 3 und 4. Die Untereinheit GluR2 wird kaum exprimiert, wodurch AMPA-Rezeptoren in neuronalen Astrozyten und Oligodendrozyten calciumdurchlässig sind²⁹⁰. Die Expression funktionaler NMDA-Rezeptoren in Gliazellen wurde hingegen lang kontrovers diskutiert. Letztendlich konnten in aus kortikalen Schnitten isolierten Astrozyten NMDA-induzierte und durch den spezifischen NMDA-Rezeptor Blocker MK801 inhibierbare Calciumströme elektrophysiologisch nachgewiesen werden²⁹¹. NMDAR-medierte Ströme konnten ebenfalls in Oligodendrozyten beobachtet werden²⁹². Auch in der vorliegenden Arbeit konnten die Untereinheiten NR1 und NR2 des NMDA-Rezeptors via Immunfluoreszenzfärbung in Gliazellen nachgewiesen werden (Abb. 45).

Weder in neuronalen Stammzellen noch in Gliazellen konnte eine verbesserte Reparatur von strahleninduzierten DNS DSBs beobachtet werden (Abb. 46 A). Ebenso wurden keine DNS DSBs durch die Aktivierung des glutamatergen Systems induziert (Abb. 46 B). Die Aktivierung der Top2B durch den NMDAR-medierten Ca^{2+} -Einstrom und die damit einhergehende verbesserte Reparatur von strahleninduzierten DNS DSBs, stellt somit einen exklusiv in Neuronen vorkommenden Signalweg dar. Der Top2B-medierte Signalweg ist für die Physiologie von Neuronen in vielerlei Hinsicht von Bedeutung. Durch die Aktivierung des glutamatergen Systems werden Brüche in Promotorregionen von IEGs wie c-Fos oder Egr1 gesetzt, wodurch die räumliche Nähe und damit die Interaktion zwischen Promotor- und Enhancerregion ermöglicht wird. Dies führt letztendlich zur Transkription

²⁸⁵ LoTurco et al. 1995; Behar et al. 1999; Maric et al. 2000; Hirasawa et al. 2003.

²⁸⁶ Whitney et al. 2008.

²⁸⁷ Sommer et al. 1991; Higuchi et al. 2000.

²⁸⁸ Balazs 2006.

²⁸⁹ Sontheimer et al. 1988; Enkvist et al. 1989; Seifert und Steinhäuser 2001.

²⁹⁰ Burnashev et al. 1992; Porter und McCarthy 1995; Verkhratsky et al. 1998.

²⁹¹ Lalo et al. 2006.

²⁹² Káradóttir et al. 2005.

der IEGs²⁹³. Das IEG c-Fos wird in Fibroblasten nach UV Bestrahlung stark exprimiert und soll maßgeblich bei der Regulation der Schadensantwort gegen den genotoxischen Effekt der UV-Strahlung beteiligt sein²⁹⁴. Zellen, die kein c-Fos exprimieren können, sind hypersensitiv gegenüber Röntgenstrahlung²⁹⁵. Zusätzlich konnte in Gliomzellen eine bestehende Radioresistenz auf die Überexpression von c-Fos zurückgeführt werden²⁹⁶. Es ist demnach denkbar, dass die Transkription von IEGs wie c-Fos zu einer Unterstützung der DNS-Schadensantwort in Neuronen führen kann. In erster Linie steht die Transkription von IEGs allerdings im Zusammenhang mit der synaptischen Plastizität. So konnte gezeigt werden, dass die Expression von c-Fos spezifisch mit dem Lernen in Verhaltenstests korreliert²⁹⁷. Hingegen ist die Egr1 Expression bei neuronaler Aktivität kontinuierlich erhöht²⁹⁸ und mediert die Expression von einigen *late response genes*, die besonders während des Wachstums und für die Plastizität des neuronalen Netzwerkes entscheidend sind²⁹⁹. Eine Disharmonie in der Expression von IEGs führt zu neurologischen Krankheiten wie Depression, Schizophrenie und Angstzuständen³⁰⁰.

5.4.4 Protektiver Effekt Glutamats auf die Spontanaktivität von Neuronen

Die funktionale Integrität des neuronalen Netzwerkes ist von vielen Faktoren abhängig und wird von ebenso vielen Faktoren moduliert. Ionisierende Strahlung gefährdet dieses System. Selbst Niedrigdosisstrahlung kann zu einer Beeinträchtigung der neuronalen Aktivität führen³⁰¹.

Nachdem in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass Glutamat einen positiven Effekt auf die Reparatur von strahleninduzierten DNS DSBs hat, sollte die physiologische Relevanz dieses Effektes auf die Funktionalität des neuronalen Netzwerkes überprüft werden. Als Indikator für neuronale Aktivität wurde die Spontanaktivität der Neuronenkultur untersucht. Spontanaktivität tritt schon in der frühen embryonalen Neurogenese auf und verstärkt sich während der Differenzierung von Vorläuferzellen zu adulten Neuronen³⁰². Dabei reguliert die Spontanaktivität positiv die

²⁹³ Madabhushi et al. 2015.

²⁹⁴ Haas und Kaina 1995.

²⁹⁵ Lackinger et al. 2001.

²⁹⁶ Liu et al. 2016.

²⁹⁷ Onodera et al. 1989; Kaczmarek und Nikołajew 1990; Tischmeyer et al. 1990.

²⁹⁸ Worley et al. 1991; Beckmann et al. 1997.

²⁹⁹ Sukhatme et al. 1988; Bozon et al. 2003; Maddox et al. 2011.

³⁰⁰ Gallo et al. 2018.

³⁰¹ Kerstin Rau 2018; Kempf et al. 2015; Mizumatsu et al. 2003.

³⁰² Kayama et al. 2018; Weissman et al. 2004; Platel und Kelsch 2013.

Synaptogenese³⁰³ und das Zellüberleben³⁰⁴. In einem funktionalen reifen Netzwerk treten sowohl spontan- als auch Signal-initiierte Aktionspotentiale auf³⁰⁵.

Tatsächlich bewirkte die Bestrahlung mit 500 mGy eine signifikante Reduktion der Spontanaktivität in der Neuronenkultur. Gleichzeitig reduzierte die Niedrigdosisbestrahlung auch die Amplitudenstärke der ausgewerteten Signale. Eine gestörte Signalweiterleitung kann schwerwiegende neurologische Krankheiten zur Folge haben, wie Alzheimer³⁰⁶, Schizophrenia³⁰⁷ und Depression³⁰⁸. In diesem Kontext besonders interessant war die Beobachtung, dass die Impulsbehandlung mit Glutamat die strahleninduzierte Reduktion der Spontanaktivität verhinderte. Neben der Spontanaktivität konnte durch den Einsatz von Glutamat auch die Amplitude der Spontanereignisse aufrechterhalten werden. Glutamat verhinderte nicht nur die Effekte der Röntgenbestrahlung in den homogen Neuronenkulturen, sondern verstärkte die Spontanaktivität erheblich gegenüber der Kontrolle (s. Abb. 49 C, D).

Glutamat bewirkt demnach nicht nur eine effektivere Reparatur von strahleninduzierten DNS DSBs, sondern verhindert eine strahleninduzierte Reduktion der neuronalen Aktivität der Neuronenkultur. Ein Mechanismus, der diesen Effekte erklären könnte, wurde erst vor ein paar Jahren in Neuronen näher beschrieben. Dabei soll neuronale Aktivität und die damit einhergehende Aktivierung des glutamatergen Systems zu Transkription spezifischer *immediate early genes* (IEGs) führen³⁰⁹. Dabei involviert ist das Enzym Topoisomerase II-beta, welches gezielt DNS Doppelstrangbrüche in Promotorregionen von IEGs wie BDNF setzt und so Raum für die Transkriptionsmaschinerie schafft (s. Abb. 31)³¹⁰. Das transkribierte Neurotrophin BDNF bindet hochspezifisch und selektiv an den TrkB Rezeptor³¹¹. Durch dessen Aktivierung werden eine Reihe an intrazellulären Signalkaskaden initiiert, welche das Zellüberleben unterstützen³¹². Eine Hochregulation des Wachstumsfaktors BDNF steht daher im engen Zusammenhang Neurone vor dem Zelltod und Degeneration zu schützen³¹³. Zudem wirkt BDNF durch die Regulation der DNS-Schadensantwort neuroprotektiv³¹⁴.

³⁰³ Zito und Svoboda 2002.

³⁰⁴ Mennerick und Zorumski 2000.

³⁰⁵ Carleton et al. 2003; Odawara et al. 2014.

³⁰⁶ Tracy und Gan 2018.

³⁰⁷ Owen et al. 2016.

³⁰⁸ Liu et al. 2017.

³⁰⁹ Crowe et al. 2006; Madabhushi et al. 2015.

³¹⁰ Suberbielle et al. 2013; Madabhushi und Kim 2018.

³¹¹ Notaras und van den Buuse 2019.

³¹² Reichardt 2006; Chen et al. 2013.

³¹³ Song et al. 2015; Nagahara et al. 2009; Hanif et al. 2015; Lawson et al. 2014.

³¹⁴ Yang et al. 2014.

Eine Behandlung mit Glutamat über Nacht hätte demzufolge den Effekt, dass die DNS-Schadensantwort hochreguliert und strahleninduzierte DNS DSBs dadurch effektiver repariert werden. Eine effektivere Reparatur von DNS DSBs bewahrt die Neurone nicht nur vor dem Zelltod, sondern schützt gleichzeitig ihre Funktionalität (= Spontanaktivität) im Netzwerk. Der neuroprotektive Effekt des Transmitters Glutamat könnte so strahleninduzierten Schäden und deren Langzeitfolgen entgegenwirken.

6 Diskussion

Die Entwicklung und Ausreifung des Gehirns ist mit der Geburt nicht abgeschlossen. So besteht eine lebenslange Integration junger Neurone in das neuronale Netzwerk³¹⁵. Diese postnatale, adulte Neurogenese, kann positiv oder negativ moduliert werden. Positiv, unter anderem durch physische Aktivität³¹⁶ und einer abwechslungsreichen, stimulierenden Umgebung³¹⁷. Negativ, durch interne Prozesse, wie einer Cortisol-Überschussproduktion³¹⁸ und dem natürlichen Alterungsprozess³¹⁹ oder durch externe Einflussfaktoren, wie Röntgenstrahlung. Röntgenstrahlung kann erhebliche Schäden, besonders in proliferierenden Zellen, verursachen³²⁰. Aufgrund dessen sind Strahlentherapien, wirksame Strategien gegen schnell proliferierende Krebsgeschwüre³²¹. Aber gleichzeitig auch eine Gefahr für die normale kognitive Entwicklung. In sensiblen Entwicklungsphasen des embryonalen³²², frühen postnatalen³²³ und adulten Stadiums³²⁴ kann bereits niedrigdosierte Röntgenstrahlung irreparable Schäden hervorrufen. Die Analyse kurzfristiger Strahlungseffekte auf unterschiedliche neuronale Entwicklungsstadien und die Bestimmung langfristiger Folgen, ist daher umso wichtiger.

Im ersten Kapitel wurden die Effekte einer Niedrigdosisbestrahlung zu den Entwicklungszeitpunkten E14.5 und p10 am Rad54^{-/-} Mausmodell untersucht. Die embryonale Entwicklungsphase E14.5 beschreibt bei Mäusen die Phase der massiven Zellproliferation in der ventrikulären und subventrikulären Zone³²⁵. Im Menschen entspricht diese Phase der Proliferation und Migration der sechsten embryonalen Entwicklungswoche³²⁶. Zu diesem Zeitpunkt formt sich der Hippocampus aus der proliferativen Zone der kortikalen Platte, und bildet das *Subiculum*, die Pyramidenzellen und schließlich den *Gyrus dentatus*³²⁷. Die frühe postnatale Phase p10 besteht bei Nagern aus einem Wachstumsschub des Gehirns³²⁸, bei welchem die Dichte der Axone und Dendriten drastisch

³¹⁵ Ming und Song 2011.

³¹⁶ van Praag et al. 1999.

³¹⁷ Fan et al. 2007.

³¹⁸ Li et al. 2006.

³¹⁹ Gould et al. 1999a; Kuhn et al. 1996.

³²⁰ Raber et al. 2004.

³²¹ Posner 1992; Apra et al. 2018; Pruitt 2017.

³²² Devi et al. 1994.

³²³ Hall et al. 2004.

³²⁴ Mizumatsu et al. 2003.

³²⁵ Goffinet 2018; Rakic und Caviness 1995.

³²⁶ Bayer et al. 1993.

³²⁷ Bayer 1980.

³²⁸ Bockhorst et al. 2008.

zunimmt³²⁹ und die Gliogenese ihren Höhepunkt erreicht³³⁰. Gleichzeitig wird zu diesem Zeitpunkt der Großteil an radialen Gliazellen generiert³³¹. Diese neuronalen Stammzellen dienen in der späteren Entwicklung als Pool für junge Neurone die von der subgranulären Zone (SGZ) in den *Gyrus dentatus* (GD) einwandern³³². Im Vergleich zu den Nagern, beginnt beim Menschen die Entwicklung des Hippocampus früher und erstreckt sich zudem über einen größeren Zeitraum³³³. Die äquivalente Entwicklungsphase beim Menschen ist, die späte Fetus-Entwicklung bis zum Kleinkindalter³³⁴. Sowohl E14.5 als auch p10 beschreiben somit Entwicklungsphasen, die durch externe Faktoren, wie Röntgenstrahlung, sensibel gestört werden können.

Ein direkter Effekt der Röntgenstrahlung ist die Induktion von DNS Doppelstrangbrüchen (DSBs)³³⁵. Um diesen Effekt und die Folgen daraus genauer analysieren zu können, wurde im zweiten Kapitel dieser Arbeit die murine Zelllinie J1 als Modellsystem gewählt. Die üblicherweise als neuronale Stammzellen (NSZ) vorliegende Zelllinie J1³³⁶, lässt sich aufgrund ihrer multipotenten Eigenschaften, durch Veränderung der Kultivierungsbedingungen zu homogenen Neuronen-, Astrozyten- und Oligodendrozytenkulturen differenzieren. NSZ haben die Fähigkeit sich immer wieder selbst zu erneuern (symmetrische Teilung) oder eine Vorläuferzelle hervorzubringen (asymmetrische Teilung)³³⁷. Diese Vorläuferzelle kann sich durch extrinsische und intrinsische Signale weiterentwickeln und schließlich zu einer Gliazelle (Astrozyt, Oligodendrozyt) oder zu einem Neuron differenzieren³³⁸. *In vivo* bietet die subgranuläre Zone als Stammzellnische das ideale Milieu für Stammzellen, sich im proliferierenden, sich selbst erneuernden Zustand zu erhalten. Externe Signale sorgen hingegen dafür, dass Stammzellen aus ihrer Nische in den *Gyrus dentatus* migrieren und dabei zu Neuronen differenzieren³³⁹. *In vitro* können die verschiedensten Bedingungen nachgeahmt und somit aus den neuronalen Stammzellen neben Neuronen auch Astrozyten und Oligodendrozyten generiert werden³⁴⁰. Der Vorteil des *in vitro* Systems J1 ist, dass jeder neuronaler Zelltyp separat auf seine spezifische Radiosensitivität untersucht werden konnte. Ein Maß wie radiosensitiv ein Zelltyp

³²⁹ Baloch et al. 2009.

³³⁰ Catalani et al. 2002.

³³¹ Piatti et al. 2006; Hochgerner et al. 2018.

³³² Kriegstein und Alvarez-Buylla 2009.

³³³ Zhong et al. 2020.

³³⁴ Semple et al. 2013.

³³⁵ Ward 1988.

³³⁶ Conti et al. 2005.

³³⁷ Bonaguidi et al. 2011.

³³⁸ Kriegstein und Alvarez-Buylla 2009.

³³⁹ Song et al. 2012; Abbott und Nigussie 2020.

³⁴⁰ Conti et al. 2005.

ist, kann über verschiedene Faktoren ermittelt werden. So kann die Anzahl der strahleninduzierten DNS DSBs ein Maß für Radiosensitivität sein oder die Effektivität (Schnelligkeit, Fehlerfreiheit) mit welcher diese Brüche repariert werden. Ein sehr deutlicher Faktor der Strahlensensitivität ist die eingeleitete Apoptose. Besonders die stark proliferierenden Stammzellen sollen nach Röntgenbestrahlung überwiegend Apoptose einleiten. Allerdings ist dies häufig bei moderaten bis hohen Dosen der Fall³⁴¹. Niedrigdosisbestrahlung bewirkt in neuronalen Zellen nicht zwangsläufig eine direkte Induktion von Apoptose. Häufig kommt es zu anderen strahleninduzierten Schäden, die erst im späteren Verlauf zur Ursache von Apoptose oder Nekrose werden³⁴². Entsprechende Ergebnisse konnten in dieser Arbeit festgestellt werden. Eine Bestrahlungsdosis von 500 mGy verursachte weder in den neuronalen Stammzellen, noch in den Deszendentenkulturen eine erhöhte Apoptoserate. Die Induktion von DNS DSBs als Maß für eine Strahlensensitivität zu nutzen war ebenso ungeeignet, da neuronale Stammzellen aufgrund ihrer häufigen Zellteilung, rein physiologisch schon ein hohes Maß an DNS DSBs aufweisen³⁴³. Ebenso wie Neurone, die aufgrund ihres hohen Metabolismus mit einer erhöhten Dosis an freien Radikalen und zwangsläufig mit einer erhöhten Induktion an DNS DSBs umgehen müssen³⁴⁴. Aufgrund dessen wurde als Maß für die Strahlensensitivität die Effizienz der DNS DSB-Reparatur analysiert.

Neuronale Stammzellen besitzen im Gegensatz zu ihren postmitotischen Deszendenten, hauptsächlich zwei Mechanismen für die Reparatur von DNS DSBs, die homologe Rekombination (HR) und die nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ)³⁴⁵. Die HR gilt als fehlerfreie, aber langsame Reparatur und ist begrenzt auf die Zellzyklusphasen S und G2. Die NHEJ ist während des gesamten Zellzyklus einsatzbereit, schneller in der Reparatur von DNS DSBs, dafür aber auch fehleranfälliger als die HR³⁴⁶. Fehlerhaft reparierte Brüche in Gensequenzen die noch transkribiert werden, können zu dysfunktionalen Proteinen bis hin zu entarteten Zellen führen³⁴⁷. DNS DSBs die nicht repariert werden, akkumulieren in der Zelle und können Ursache für eine spätere Induktion von Apoptose sein³⁴⁸. Umso paradoxer war die Beobachtung, dass gerade Neurone eine äußerst ineffiziente Reparatur der strahleninduzierten DNS DSBs zeigen. Allerdings konnte in vorangegangenen Studien

³⁴¹ Peissner et al. 1999; Nagai et al. 2000a; Tada et al. 2000.

³⁴² Wu et al. 2012; Tucker 2008; Guéguen et al. 2019.

³⁴³ Bouwman und Crosetto 2018.

³⁴⁴ Magistretti und Allaman 2015.

³⁴⁵ Brnzei und Foiani 2008.

³⁴⁶ Mao et al. 2008; Lieber 2008.

³⁴⁷ Fishel et al. 2007; Shanbhag et al. 2019; Kim und Lee 2003.

³⁴⁸ Merlo et al. 2016.

ebenfalls beobachtet werden, dass Neurone, die ein Leben lang funktional sein müssen³⁴⁹ und metabolisch hoch aktiv sind³⁵⁰, dennoch eine verminderte DNS DSB-Reparaturkapazität aufweisen. So zeigten Sharma und Vyjayanti in unabhängigen Versuchen, dass die NHEJ-Kapazität in älter werdenden Neuronen rapide sinkt³⁵¹. Das DNS DSBs allerdings nicht immer verheerende Wirkungen haben müssen, zeigten Superbielle und Madabhushi. Sie beobachteten, dass physiologische Aktivität in Nagern zu einer Induktion von DNS DSBs in spezifischen Promotorregionen von *immediate early genes* (IEGs) führt. Durch die Topoisomerase II-beta (Top2B) mediierte Bruch, setzt eine Signalkaskade in Gang, die am Ende zur Transkription der IEGs führt³⁵². IEGs können selbst oder über die Aktivierung von weiteren Transkriptionsfaktoren, sowie neurotrophen Faktoren, neuroprotektiv wirken³⁵³. Ausgelöst wird dieser Prozess über die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren in Neuronen³⁵⁴. NMDA-Rezeptoren gehören zu den ionotropen Glutamatrezeptoren und sind calciumpermeabel³⁵⁵. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass der Einsatz von Glutamat zur Induktion von DNS DSBs und gleichzeitig zu einer verbesserten Reparatur von strahleninduzierten DNS DSBs führt. Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass durch die Inhibition der NMDA-Rezeptoren, der Effekt der verbesserten Reparatur blockiert wird. Wie wichtig eine vollständige Reparatur von DNS DSBs in Neuronen ist, zeigt die Pathogenese von neurodegenerativen Krankheiten wie Alzheimer, Demenz oder Parkinson³⁵⁶.

Die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit unterstützen die Hypothese, dass akkumulierte DNS DSBs zu Funktionsstörungen in Neuronen führen. So bewirkte die Bestrahlung mit 500 mGy eine Reduktion der Spontanaktivität in homogenen Neuronenkulturen. Die Spontanaktivität der Neurone konnte bewahrt werden, wenn diese zuvor mit Glutamat behandelt wurden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Neurone auch im Niedrigdosisbereich strahlensensitiv reagieren, dass die Aktivierung des glutamatergen Systems neuroprotektiv wirkt und dass DNS DSBs heterogene Faktoren sind, die physiologisch auftretend überlebenswichtig sind, strahleninduziert jedoch verheerende Ausmaße annehmen können.

Welche entscheidende Rolle die Reparatur von DNS DSBs für die kognitive Funktionalität spielt, wird ebenso durch die *in vivo* Versuche deutlich. Das HR-defiziente Mausmodell Rad54^{-/-} entwickelte sich

³⁴⁹ Siegel und Agranoff 1994.

³⁵⁰ Magistretti und Allaman 2015.

³⁵¹ Sharma 2007; Vyjayanti und Rao 2006.

³⁵² Madabhushi et al. 2015; Superbielle et al. 2013.

³⁵³ Gallo et al. 2018; Pérez-Cadahía et al. 2011; Chen et al. 2013.

³⁵⁴ Madabhushi und Kim 2018.

³⁵⁵ Vyklicky et al. 2014.

³⁵⁶ Adamec et al. 1999; Shanbhag et al. 2019; Bender et al. 2006; Ferman und Boeve 2007.

phänomenologisch normal, allerdings zeigte es starke Beeinträchtigungen im räumlichen Lernen. Zusätzlich war die Anzahl der jungen Neuronen im *Gyrus dentatus* signifikant reduziert. Möglich ist, dass die defizitäre HR schon zu Beginn der Entwicklung der Rad54^{-/-} Mäuse zu einer Akkumulation von DNS DSBs in den embryonalen Stammzellen führt. Besonders embryonale Zellen, die sich viel und schnell teilen³⁵⁷ müssen die Integrität ihres Genoms aufrechterhalten, um nicht zu entarten. Dafür ist die akkurate Reparatur von DNS DSBs durch die homologe Rekombination unerlässlich³⁵⁸. Ist der Mechanismus der DNS DSBs-Reparatur beeinträchtigt, können Zellzyklus-Kontrollpunkte die Zellen im Zellzyklus verharren lassen oder Apoptose einleiten, um beschädigte Zellen an einer Zellteilung zu hindern³⁵⁹. Dies hätte eine Reduktion der Stammzellen im Embryonalstadium zur Folge, das wiederum zu einer reduzierten Anzahl an Stammzellen in der sich später entwickelnden subgranulären Zone (SGZ) führen würde. Der Ursprung der adulten Stammzellen aus der SGZ ist bis heute umstritten. So sollen sie einerseits aus Zellen des embryonalen Neuroepithelium entstehen, welche schon während der embryonalen Entwicklungsphase für die Bildung von Körnerzellen verantwortlich gewesen sind³⁶⁰; zum anderen können die adulten NSZ aus einer späten Phase der Embryonalentwicklung stammen, wenn sie aus einer Population von *sonic hedgehog* (*Shh*)-responsive-Zellen aus dem ventralen Hippocampus hervorgehen. Die Deszendenten dieser Population sollen während der weiteren Entwicklung in den dorsalen Hippocampus einwandern und dort die Quelle der adulten NSZ bilden³⁶¹. Eine reduzierte Anzahl an adulten Stammzellen in der subgranulären Zone hätte zur Folge, dass weniger junge Neurone in das neuronale Netzwerk des *Gyrus dentatus* integriert werden können. Denkbar ist zudem, dass nicht die Stammzellen aufgrund akkumulierter DNS DSBs apoptotisch werden, sondern die Vorläuferzellen, welche in den *Gyrus dentatus* migrieren. Während der Migration und Maturation durchlaufen die Vorläuferzellen kritische Phasen, in denen sie besonders sensitiv auf Störfaktoren reagieren³⁶². Eine zusätzliche Belastung durch akkumulierte DNS DSBs könnte zum Zelltod vieler junger Neurone und so zu einer Beeinträchtigung des räumlichen Denkvermögens führen. Interessanterweise zeigen die an E14.5 und p10 mit 500 mGy bestrahlten Wildtypmäuse ähnliche Ergebnisse. So korreliert auch in diesem Fall, der Verlust an jungen Neuronen mit einem ausgeprägten räumlichen Lerndefizit. So konnte Klink zeigen, dass sowohl in den an E14.5 500 mGy bestrahlten als auch in den an p10 500 mGy

³⁵⁷ Götz und Huttner 2005; Arai et al. 2011.

³⁵⁸ Prakash et al. 2015; Katsuki und Takata 2016; Tacconi und Tarsounas 2015.

³⁵⁹ Hartwell und Weinert 1989; Roque et al. 2012.

³⁶⁰ Kriegstein und Alvarez-Buylla 2009.

³⁶¹ Li et al. 2013.

³⁶² Ming und Song 2011.

bestrahlten Tieren eine Reduktion an DCX positiven Zellen im *Gyrus dentatus* vorliegt und dass diese verminderte Neurogenese mit einem beeinträchtigten räumlichen Denkvermögen einhergeht³⁶³.

6.1 Schlussfolgerung

In einer Zeit, in der Röntgenstrahlung zum modernen Leben des Menschen gehört; sei es nun zur Bekämpfung von Tumoren³⁶⁴, für die medizinischen Bildgebung und Diagnostik³⁶⁵ oder die Strahlenbelastung durch Flugzeug- und Raumfahrten³⁶⁶, ist es essentiell die Prozesse zu verstehen, welche die Strahlung im menschlichen Körper auslöst. In dieser Arbeit wurde der folgenreichste Effekt der Röntgenstrahlung, die Induktion von DNS DSBs, im neuronalen System untersucht. Die dafür verwendeten murinen *in vitro* und *in vivo* Modelle lieferten Erkenntnisse darüber, dass neuronale Zellen, sowohl im embryonalen, postnatalen und adulten Stadium radiosensitiv reagieren. Die Radiosensitivität äußerte sich bei einer Dosis von 500 mGy nicht in einer direkten Erhöhung der Apoptoserate der neuronalen Zellen, stattdessen konnte eine verlangsamte Reparatur von DNS DSBs in Neuronen beobachtet werden. Diese verzögerte Reparatur, sorgte in den homogenen Neuronenkulturen für eine Reduktion der Spontanaktivität und einer Abschwächung der Signalamplituden. Störungen im neuronalen Netzwerk wurden auch durch eine defizitäre HR ausgelöst, die aufgrund einer Gendeletion des Reparaturproteins Rad54 im Rad54^{-/-} Mausmodell bestand. So weisen die Rad54^{-/-} Mäuse eine Beeinträchtigung im komplexen räumlichen Lernen auf. Das beeinträchtigte Denkvermögen korreliert mit der reduzierten Anzahl an jungen Neuronen im *Gyrus dentatus* der Tiere. Offensichtlich führt die Induktion, Akkumulation bzw. die nicht korrekte Reparatur von DNS DSBs zu kognitiven Schäden. In vorausgehenden Studien konnte eine Verbindung zwischen nicht bzw. fehlerhaft reparierten DNS DSBs und neurodegenerativen Krankheiten beobachtet werden³⁶⁷. Ob eine Akkumulation von DNS DSBs in den embryonalen Stammzellen der Rad54^{-/-} Mäusen zu einer Reduktion des Stammzellpools der SGZ und damit zu einer verminderten Generationsfähigkeit von jungen Neuronen führt, müsste mit histologischen- und Sequenzierungs-Methoden untersucht werden. Dafür könnte die Anzahl der Stammzellen durch Immunfluoreszenzfärbungen in der SGZ, und die Anzahl an DNS DSBs durch *Next-Generation Sequencing* bestimmt werden³⁶⁸.

³⁶³ Laura Trundle | Fusion Conferences; BNA 2017 Festival of Neuroscience: Abstract Book 2017.

³⁶⁴ Posner 1992.

³⁶⁵ Fahimian et al. 2013.

³⁶⁶ Mc Laughlin 2015.

³⁶⁷ Adamec et al. 1999; Biton et al. 2008; Bender et al. 2006.

³⁶⁸ Baranello et al. 2018.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen auch, dass die Induktion von DNS DSBs nicht zwangsläufig schädlich für die Zelle sein muss. DNS DSBs treten auch unter physiologischen Bedingungen auf und sind mitunter überlebenswichtig. Dazu zählen Prozesse wie die endogen induzierten DSBs während der Zellteilung³⁶⁹ oder generierte DSBs bei der somatischen Rekombination von B-Zellen³⁷⁰. Darüber hinaus wurde ein System in Neuronen beschrieben, bei dem DNS DSBs, mediiert durch das Enzym Topoisomerase II-beta, gezielt in Promotorregionen von *immediate early genes* (IEGs) gesetzt werden, um deren Transkription zu ermöglichen³⁷¹. Ein Anstieg der IEG-Expression steht im Zusammenhang mit der Fähigkeit schneller auf Umwelteinflüsse reagieren zu können und das Zellüberleben zu stärken³⁷². Aktiviert wird dieser Signalweg über das glutamaterge System³⁷³. Tatsächlich zeigte die Behandlung der homogenen Neuronenkultur einerseits die Induktion von DNS DSBs und gleichzeitig eine verbesserte Reparatur von strahleninduzierten DNS DSBs. Dadurch erhielt Glutamat nicht nur die Spontanaktivität der Neuronen aufrecht, sondern verstärkte diese noch. Dieser Effekt ist für die Neuronen exklusiv. Eine verbesserte Reparatur von strahleninduzierten DNS DSBs konnte nicht in den Glia- oder Stammzellkulturen beobachtet werden. Ob die Induktion von DNS DSBs durch Glutamat in der homogenen Neuronenkultur tatsächlich über die physiologische Signalkaskade mit Top2B ausgelöst wird, kann über das Expressionsmuster von IEGs wie cFos bestimmt werden. Zudem könnte die Aktivität der Top2B durch den Inhibitor Merbarone³⁷⁴ blockiert und die neuroprotektive Wirkung von Glutamat erneut getestet werden. Eine differenziertere Untersuchung von DNS DSBs ist weiterhin nötig, um die Unterschiede zwischen gefährdenden und schützenden Brüchen auszumachen.

Insgesamt zeigen die Untersuchungen dieser Arbeit, dass neuronale Zellen unabhängig von ihrem Differenzierungsstatus sensitiv auf Niedrigdosisstrahlung reagieren, dass diese Sensitivität auf die Induktion, Akkumulation oder dysfunktionale Reparatur von DNS DSBs zurückzuführen ist und dass DNS DSBs eine Vielzahl von Signalwegen in neuronalen Zellen auslösen, die je nach Induktion - extern durch Röntgenstrahlung oder intern durch Aktivierung von NMDA-Rezeptoren - das Zellüberleben stärken oder gefährden.

³⁶⁹ Bouwman und Crosetto 2018.

³⁷⁰ Roth 2014.

³⁷¹ Madabhushi et al. 2015; Suberbielle et al. 2013.

³⁷² Mandraju et al. 2011; Yang et al. 2014; Nagahara et al. 2009; Haas und Kaina 1995.

³⁷³ Madabhushi und Kim 2018.

³⁷⁴ Drake et al. 1989.

7 Literaturverzeichnis

- Abayomi, O. K. (1996): Pathogenesis of irradiation-induced cognitive dysfunction. In: *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)* 35 (6), S. 659–663. DOI: 10.3109/02841869609083995.
- Abbott, Louise C.; Nigussie, Fikru (2020): Adult neurogenesis in the mammalian dentate gyrus. In: *Anatomia, histologia, embryologia* 49 (1), S. 3–16. DOI: 10.1111/ahel.12496.
- Abel, T.; Lattal, K. M. (2001): Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. In: *Current Opinion in Neurobiology* 11 (2), S. 180–187. DOI: 10.1016/s0959-4388(00)00194-x.
- Abraham, Robert T. (2004): PI 3-kinase related kinases: 'big' players in stress-induced signaling pathways. In: *DNA repair* 3 (8-9), S. 883–887. DOI: 10.1016/j.dnarep.2004.04.002.
- Adamec, E.; Vonsattel, J. P.; Nixon, R. A. (1999): DNA strand breaks in Alzheimer's disease. In: *Brain Research* 849 (1-2), S. 67–77. DOI: 10.1016/s0006-8993(99)02004-1.
- Aggarwal, Shweta; Yurlova, Larisa; Simons, Mikael (2011): Central nervous system myelin: structure, synthesis and assembly. In: *Trends in cell biology* 21 (10), S. 585–593. DOI: 10.1016/j.tcb.2011.06.004.
- Aimone, James B.; Wiles, Janet; Gage, Fred H. (2009): Computational influence of adult neurogenesis on memory encoding. In: *Neuron* 61 (2), S. 187–202. DOI: 10.1016/j.neuron.2008.11.026.
- Akaike, A. (1994): Glutamate neurotoxicity and neuroprotective factors. In: *Nihon yakurigaku zasshi. Folia pharmacologica Japonica* 103 (5), S. 193–201. DOI: 10.1254/fpj.103.193.
- Akazawa, C.; Shigemoto, R.; Bessho, Y.; Nakanishi, S.; Mizuno, N. (1994): Differential expression of five N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNAs in the cerebellum of developing and adult rats. In: *The Journal of comparative neurology* 347 (1), S. 150–160. DOI: 10.1002/cne.903470112.
- Akiyama, H. (1994): Inflammatory response in Alzheimer's disease. In: *The Tohoku journal of experimental medicine* 174 (3), S. 295–303. DOI: 10.1620/tjem.174.295.
- Alam, Md Jahangir; Kitamura, Takashi; Saitoh, Yoshito; Ohkawa, Noriaki; Kondo, Takashi; Inokuchi, Kaoru (2018): Adult Neurogenesis Conserves Hippocampal Memory Capacity. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 38 (31), S. 6854–6863. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2976-17.2018.
- Al-Hallaq, Rana A.; Conrads, Thomas P.; Veenstra, Timothy D.; Wenthold, Robert J. (2007): NMDA Di-Heteromeric Receptor Populations and Associated Proteins in Rat Hippocampus. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27 (31), S. 8334–8343. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2155-07.2007.
- Allen, Nicola J.; Bennett, Mariko L.; Foo, Lynette C.; Wang, Gordon X.; Chakraborty, Chandrani; Smith, Stephen J.; Barres, Ben A. (2012): Astrocyte glypicans 4 and 6 promote formation of excitatory synapses via GluA1 AMPA receptors. In: *Nature* 486 (7403), S. 410–414. DOI: 10.1038/nature11059.
- Alsaad, Hassan A.; DeKorver, Nicholas W.; Mao, Zhihao; Dravid, Shashank M.; Arikath, Jyothi; Monaghan, Daniel T. (2019): In the Telencephalon, GluN2C NMDA Receptor Subunit mRNA is Predominately Expressed in Glial Cells and GluN2D mRNA in Interneurons. In: *Neurochemical Research* 44 (1), S. 61–77. DOI: 10.1007/s11064-018-2526-7.
- Altman, J. (1962): Are new neurons formed in the brains of adult mammals? In: *Science (New York, N.Y.)* 135 (3509), S. 1127–1128. DOI: 10.1126/science.135.3509.1127.
- Altman, J. (1963): Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. In: *The Anatomical record* 145, S. 573–591. DOI: 10.1002/ar.1091450409.
- Alvarez-Buylla, Arturo; García-Verdugo, Jose Manuel (2002): Neurogenesis in Adult Subventricular Zone. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22 (3), S. 629–634. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.22-03-00629.2002.
- Anderson, L.; Henderson, C.; Adachi, Y. (2001): Phosphorylation and rapid relocalization of 53BP1 to nuclear foci upon DNA damage. In: *Molecular and cellular biology* 21 (5), S. 1719–1729. DOI: 10.1128/MCB.21.5.1719-1729.2001.
- Andres, Sara N.; Vergnes, Alexandra; Ristic, Dejan; Wyman, Claire; Modesti, Mauro; Junop, Murray (2012): A human XRCC4-XLF complex bridges DNA. In: *Nucleic acids research* 40 (4), S. 1868–1878. DOI: 10.1093/nar/gks022.
- Anis, N.; Sherby, S.; Goodnow, R.; Niwa, M.; Konno, K.; Kallimopoulos, T. et al. (1990): Structure-activity relationships of philanthotoxin analogs and polyamines on N-methyl-D-aspartate and nicotinic acetylcholine receptors. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 254 (3), S. 764–773.
- Apra, Caroline; Peyre, Matthieu; Kalamarides, Michel (2018): Current treatment options for meningioma. In: *Expert review of neurotherapeutics* 18 (3), S. 241–249. DOI: 10.1080/14737175.2018.1429920.
- Arai, Yoko; Pulvers, Jeremy N.; Haffner, Christiane; Schilling, Britta; Nüsslein, Ina; Calegari, Federico; Huttner, Wieland B. (2011): Neural stem and progenitor cells shorten S-phase on commitment to neuron production. In: *Nature communications* 2, S. 154. DOI: 10.1038/ncomms1155.
- Bakkenist, Christopher J.; Kastan, Michael B. (2003): DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. In: *Nature* 421 (6922), S. 499–506. DOI: 10.1038/nature01368.

- Balazs, Robert (2006): Trophic effect of glutamate. In: *Current topics in medicinal chemistry* 6 (10), S. 961–968. DOI: 10.2174/156802606777323700.
- Baloch, Sajjad; Verma, Ragini; Huang, Hao; Khurd, Parmeshwar; Clark, Sarah; Yarowsky, Paul et al. (2009): Quantification of brain maturation and growth patterns in C57BL/6J mice via computational neuroanatomy of diffusion tensor images. In: *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)* 19 (3), S. 675–687. DOI: 10.1093/cercor/bhn112.
- Bandeira, Fabiana; Lent, Roberto; Herculano-Houzel, Suzana (2009): Changing numbers of neuronal and non-neuronal cells underlie postnatal brain growth in the rat. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (33), S. 14108–14113. DOI: 10.1073/pnas.0804650106.
- Baranello, Laura; Kouzine, Fedor; Wojtowicz, Damian; Cui, Kairong; Zhao, Keji; Przytycka, Teresa M. et al. (2018): Mapping DNA Breaks by Next-Generation Sequencing. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1672, S. 155–166. DOI: 10.1007/978-1-4939-7306-4_13.
- Barazzuol, Lara; Rickett, Nicole; Ju, Limei; Jeggo, Penny A. (2015): Low levels of endogenous or X-ray-induced DNA double-strand breaks activate apoptosis in adult neural stem cells. In: *Journal of cell science* 128 (19), S. 3597–3606. DOI: 10.1242/jcs.171223.
- Barkho, Basam Z.; Song, Hongjun; Aimone, James B.; Smrt, Richard D.; Kuwabara, Tomoko; Nakashima, Kinichi et al. (2006): Identification of astrocyte-expressed factors that modulate neural stem/progenitor cell differentiation. In: *Stem cells and development* 15 (3), S. 407–421. DOI: 10.1089/scd.2006.15.407.
- Bayer, S. A. (1980): Development of the hippocampal region in the rat. II. Morphogenesis during embryonic and early postnatal life. In: *J. Comp. Neurol.* 190 (1), S. 115–134. DOI: 10.1002/cne.901900108.
- Bayer, S. A.; Altman, J.; Russo, R. J.; Zhang, X. (1993): Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat. In: *Neurotoxicology* 14 (1), S. 83–144.
- Becker, Suzanna; Wojtowicz, J. Martin (2007): A model of hippocampal neurogenesis in memory and mood disorders. In: *Trends in cognitive sciences* 11 (2), S. 70–76. DOI: 10.1016/j.tics.2006.10.013.
- Beckmann, A. M.; Davidson, M. S.; Goodenough, S.; Wilce, P. A. (1997): Differential expression of Egr-1-like DNA-binding activities in the naive rat brain and after excitatory stimulation. In: *Journal of neurochemistry* 69 (6), S. 2227–2237. DOI: 10.1046/j.1471-4159.1997.69062227.x.
- Behar, T. N.; Scott, C. A.; Greene, C. L.; Wen, X.; Smith, S. V.; Maric, D. et al. (1999): Glutamate acting at NMDA receptors stimulates embryonic cortical neuronal migration. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19 (11), S. 4449–4461.
- Béïque, Jean-Claude; Na, Youn; Kuhl, Dietmar; Worley, Paul F.; Huganir, Richard L. (2011): Arc-dependent synapse-specific homeostatic plasticity. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (2), S. 816–821. DOI: 10.1073/pnas.1017914108.
- Bekker-Jensen, Simon; Lukas, Claudia; Melander, Fredrik; Bartek, Jiri; Lukas, Jiri (2005): Dynamic assembly and sustained retention of 53BP1 at the sites of DNA damage are controlled by Mdc1/NFBD1. In: *The Journal of cell biology* 170 (2), S. 201–211. DOI: 10.1083/jcb.200503043.
- Bell, Rob; Duke, Aaron A.; Gilmore, Paula E.; Page, Deaglan; Bègue, Laurent (2014): Anxiolytic-like effects observed in rats exposed to the elevated zero-maze following treatment with 5-HT₂/5-HT₃/5-HT₄ ligands. In: *Scientific reports* 4, S. 3881. DOI: 10.1038/srep03881.
- Bendel, Olof; Meijer, Britt; Hurd, Yasmin; Euler, Gabriel von (2005): Cloning and expression of the human NMDA receptor subunit NR3B in the adult human hippocampus. In: *Neuroscience letters* 377 (1), S. 31–36. DOI: 10.1016/j.neulet.2004.11.064.
- Bender, Andreas; Krishnan, Kim J.; Morris, Christopher M.; Taylor, Geoffrey A.; Reeve, Amy K.; Perry, Robert H. et al. (2006): High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease. In: *Nature genetics* 38 (5), S. 515–517. DOI: 10.1038/ng1769.
- Bergmann, Olaf; Liebl, Jakob; Bernard, Samuel; Alkass, Kanar; Yeung, Maggie S. Y.; Steier, Peter et al. (2012): The age of olfactory bulb neurons in humans. In: *Neuron* 74 (4), S. 634–639. DOI: 10.1016/j.neuron.2012.03.030.
- Berridge, Michael J. (2017): Calcium signalling in health and disease. In: *Biochemical and biophysical research communications* 485 (1), S. 5. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.01.098.
- Biton, Sharon; Barzilai, Ari; Shiloh, Yosef (2008): The neurological phenotype of ataxia-telangiectasia: solving a persistent puzzle. In: *DNA repair* 7 (7), S. 1028–1038. DOI: 10.1016/j.dnarep.2008.03.006.
- Bliss, T. V.; Lomo, T. (1973): Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. In: *The Journal of physiology* 232 (2), S. 331–356. DOI: 10.1113/jphysiol.1973.sp010273.
- BNA 2017 Festival of Neuroscience: Abstract Book (2017). In: *Brain and Neuroscience Advances* 1, 239821281770527.
- Boccara, Charlotte N.; Sargolini, Francesca; Thoresen, Veslemøy Hult; Solstad, Trygve; Witter, Menno P.; Moser, Edvard I.; Moser, May-Britt (2010): Grid cells in pre- and parasubiculum. In: *Nature neuroscience* 13 (8), S. 987–994. DOI: 10.1038/nn.2602.
- Bockhorst, K. H.; Narayana, P. A.; Liu, R.; Ahobila-Vijjula, P.; Ramu, J.; Kamel, M. et al. (2008): Early postnatal development of rat brain: in vivo diffusion tensor imaging. In: *J. Neurosci. Res.* 86 (7), S. 1520–1528. DOI: 10.1002/jnr.21607.
- Boerrigter, M. E.; Wei, J. Y.; Vijg, J. (1992): DNA repair and Alzheimer's disease. In: *Journal of gerontology* 47 (6), B177–84. DOI: 10.1093/geronj/47.6.b177.

- Boldrini, Maura; Fulmore, Camille A.; Tartt, Alexandria N.; Simeon, Laika R.; Pavlova, Ina; Poposka, Verica et al. (2018): Human Hippocampal Neurogenesis Persists throughout Aging. In: *Cell stem cell* 22 (4), 589–599.e5. DOI: 10.1016/j.stem.2018.03.015.
- Bonaguidi, Michael A.; Wheeler, Michael A.; Shapiro, Jason S.; Stadel, Ryan P.; Sun, Gerald J.; Ming, Guo-li; Song, Hongjun (2011): In vivo clonal analysis reveals self-renewing and multipotent adult neural stem cell characteristics. In: *Cell* 145 (7), S. 1142–1155. DOI: 10.1016/j.cell.2011.05.024.
- Bouwman, Britta A. M.; Crosetto, Nicola (2018): Endogenous DNA Double-Strand Breaks during DNA Transactions: Emerging Insights and Methods for Genome-Wide Profiling. In: *Genes* 9 (12). DOI: 10.3390/genes9120632.
- Bouwman, Peter; Aly, Amal; Escandell, Jose M.; Pieterse, Mark; Bartkova, Jirina; van der Gulden, Hanneke et al. (2010): 53BP1 loss rescues BRCA1 deficiency and is associated with triple-negative and BRCA-mutated breast cancers. In: *Nature structural & molecular biology* 17 (6), S. 688–695. DOI: 10.1038/nsmb.1831.
- Bozon, Bruno; Davis, Sabrina; Laroche, Serge (2003): A Requirement for the Immediate Early Gene zif268 in Reconsolidation of Recognition Memory after Retrieval. In: *Neuron* 40 (4), S. 695–701. DOI: 10.1016/S0896-6273(03)00674-3.
- Braak, H.; Braak, E. (1991): Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. In: *Acta neuropathologica* 82 (4), S. 239–259. DOI: 10.1007/BF00308809.
- Brandeis, R.; Brandys, Y.; Yehuda, S. (1989): The use of the Morris Water Maze in the study of memory and learning. In: *The International journal of neuroscience* 48 (1-2), S. 29–69. DOI: 10.3109/00207458909002151.
- Branzei, Dana; Foiani, Marco (2008): Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 9 (4), S. 297–308. DOI: 10.1038/nrm2351.
- Brazel, C. Y.; Nuñez, J. L.; Yang, Z.; Levison, S. W. (2005): Glutamate enhances survival and proliferation of neural progenitors derived from the subventricular zone. In: *Neuroscience* 131 (1), S. 55–65. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2004.10.038.
- Brown, Jason P.; Couillard-Després, Sébastien; Cooper-Kuhn, Christiana M.; Winkler, Jürgen; Aigner, Ludwig; Kuhn, H. Georg (2003): Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. In: *J. Comp. Neurol.* 467 (1), S. 1–10. DOI: 10.1002/cne.10874.
- Brun, Vegard H.; Otnass, Mona K.; Molden, Sturla; Steffenach, Hill-Aina; Witter, Menno P.; Moser, May-Britt; Moser, Edvard I. (2002): Place cells and place recognition maintained by direct entorhinal-hippocampal circuitry. In: *Science (New York, N.Y.)* 296 (5576), S. 2243–2246. DOI: 10.1126/science.1071089.
- Brun, Vegard Heimly; Solstad, Trygve; Kjelstrup, Kirsten Brun; Fyhn, Marianne; Witter, Menno P.; Moser, Edvard I.; Moser, May-Britt (2008): Progressive increase in grid scale from dorsal to ventral medial entorhinal cortex. In: *Hippocampus* 18 (12), S. 1200–1212. DOI: 10.1002/hipo.20504.
- Bugreev, Dmitry V.; Mazin, Alexander V. (2004): Ca²⁺ activates human homologous recombination protein Rad51 by modulating its ATPase activity. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (27), S. 9988–9993. DOI: 10.1073/pnas.0402105101.
- Bugreev, Dmitry V.; Mazina, Olga M.; Mazin, Alexander V. (2006): Rad54 protein promotes branch migration of Holliday junctions. In: *Nature* 442 (7102), S. 590–593. DOI: 10.1038/nature04889.
- Buller, A. L.; Larson, H. C.; Schneider, B. E.; Beaton, J. A.; Morrisett, R. A.; Monaghan, D. T. (1994): The molecular basis of NMDA receptor subtypes: native receptor diversity is predicted by subunit composition. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 14 (9), S. 5471–5484.
- Bunch, Heeyoun; Lawney, Brian P.; Lin, Yu-Fen; Asaithamby, Aroumougame; Murshid, Ayesha; Wang, Yaoyu E. et al. (2015): Transcriptional elongation requires DNA break-induced signalling. In: *Nature communications* 6, S. 10191. DOI: 10.1038/ncomms10191.
- Bunting, Samuel F.; Callen, Elsa; Wong, Nancy; Chen, Hua-Tang; Polato, Federica; Gunn, Amanda et al. (2010): 53BP1 inhibits homologous recombination in Brca1-deficient cells by blocking resection of DNA breaks. In: *Cell* 141 (2), S. 243–254. DOI: 10.1016/j.cell.2010.03.012.
- Burgess, Neil; Maguire, Eleanor A.; O'Keefe, John (2002): The human hippocampus and spatial and episodic memory. In: *Neuron* 35 (4), S. 625–641. DOI: 10.1016/S0896-6273(02)00830-9.
- Burnashev, N.; Khodorova, A.; Jonas, P.; Helm, P. J.; Wisden, W.; Monyer, H. et al. (1992): Calcium-permeable AMPA-kainate receptors in fusiform cerebellar glial cells. In: *Science (New York, N.Y.)* 256 (5063), S. 1566–1570. DOI: 10.1126/science.1317970.
- Buzsáki, György; Draguhn, Andreas (2004): Neuronal oscillations in cortical networks. In: *Science (New York, N.Y.)* 304 (5679), S. 1926–1929. DOI: 10.1126/science.1099745.
- Buzsáki, György; Moser, Edvard I. (2013): Memory, navigation and theta rhythm in the hippocampal-entorhinal system. In: *Nature neuroscience* 16 (2), S. 130–138. DOI: 10.1038/nn.3304.
- Campagnoni, A. T.; Carey, G. D.; Yu, Y. T. (1980): In vitro synthesis of the myelin basic proteins: subcellular site of synthesis. In: *Journal of neurochemistry* 34 (3), S. 677–686. DOI: 10.1111/j.1471-4159.1980.tb11197.x.
- Canela, Andres; Maman, Yaakov; Jung, Seolkyoung; Wong, Nancy; Callen, Elsa; Day, Amanda et al. (2017): Genome Organization Drives Chromosome Fragility. In: *Cell* 170 (3), 507–521.e18. DOI: 10.1016/j.cell.2017.06.034.
- Carleton, Alan; Petreanu, Leopoldo T.; Lansford, Rusty; Alvarez-Buylla, Arturo; Lledo, Pierre-Marie (2003): Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb. In: *Nature neuroscience* 6 (5), S. 507–518. DOI: 10.1038/nn1048.

- Catalani, Assia; Sabbatini, Maurizio; Consoli, Claudia; Cinque, Carlo; Tomassoni, Daniele; Azmitia, Efrain et al. (2002): Glial fibrillary acidic protein immunoreactive astrocytes in developing rat hippocampus. In: *Mechanisms of ageing and development* 123 (5), S. 481–490. DOI: 10.1016/S0047-6374(01)00356-6.
- Ceccaldi, Raphael; Rondinelli, Beatrice; D'Andrea, Alan D. (2016): Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break. In: *Trends in cell biology* 26 (1), S. 52–64. DOI: 10.1016/j.tcb.2015.07.009.
- Chambers, R. Andrew; Potenza, Marc N.; Hoffman, Ralph E.; Miranker, Willard (2004): Simulated apoptosis/neurogenesis regulates learning and memory capabilities of adaptive neural networks. In: *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 29 (4), S. 747–758. DOI: 10.1038/sj.npp.1300358.
- Champoux, J. J. (2001): DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. In: *Annual review of biochemistry* 70, S. 369–413. DOI: 10.1146/annurev.biochem.70.1.369.
- Chang, Howard H. Y.; Pannunzio, Nicholas R.; Adachi, Noritaka; Lieber, Michael R. (2017): Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 18 (8), S. 495–506. DOI: 10.1038/nrm.2017.48.
- Chen, Ai; Xiong, Li-Jing; Tong, Yu; Mao, Meng (2013): The neuroprotective roles of BDNF in hypoxic ischemic brain injury. In: *Biomedical reports* 1 (2), S. 167–176. DOI: 10.3892/br.2012.48.
- Chen, L.; Chetkovich, D. M.; Petralia, R. S.; Sweeney, N. T.; Kawasaki, Y.; Wenthold, R. J. et al. (2000): Stargazin regulates synaptic targeting of AMPA receptors by two distinct mechanisms. In: *Nature* 408 (6815), S. 936–943. DOI: 10.1038/35050030.
- Chi, Dennis S.; Berchuck, Andrew; Dizon, Don S.; Yashar, Catheryn (Hg.) (2017): Principles and practice of gynecologic oncology. Seventh edition. Philadelphia, Baltimore, New York: Wolters Kluwer.
- Chi, Peter; Kwon, Youngho; Seong, Changhyun; Epshtein, Anastasiya; Lam, Isabel; Sung, Patrick; Klein, Hannah L. (2006): Yeast recombination factor Rdh54 functionally interacts with the Rad51 recombinase and catalyzes Rad51 removal from DNA. In: *The Journal of biological chemistry* 281 (36), S. 26268–26279. DOI: 10.1074/jbc.M602983200.
- Chiappalone, Michela; Vato, Alessandro; Berdondini, Luca; Koudelka-Hep, Milena; Martinoia, Sergio (2007): Network dynamics and synchronous activity in cultured cortical neurons. In: *International journal of neural systems* 17 (2), S. 87–103. DOI: 10.1142/S0129065707000968.
- Choi, D. W.; Maulucci-Gedde, M.; Kriegstein, A. R. (1987): Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 7 (2), S. 357–368.
- Christopherson, Karen S.; Ullian, Erik M.; Stokes, Caleb C. A.; Mullen, Christine E.; Hell, Johannes W.; Agah, Azin et al. (2005): Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. In: *Cell* 120 (3), S. 421–433. DOI: 10.1016/j.cell.2004.12.020.
- Chronis, Fatouros; Rogakou, Emmy P. (2007): Interplay Between γ H2AX and 53BP1 Pathways in DNA Double-Strand Break Repair Response. In: David A. Gewirtz, Shawn E. Holt und Steven Grant (Hg.): Apoptosis, Senescence, and Cancer, Bd. 383. Totowa, NJ: Humana Press (Cancer Drug Discovery and Development), S. 243–263.
- Churn, S. B.; Sombati, S.; Taft, W. C.; DeLorenzo, R. J. (1993): Excitotoxicity affects membrane potential and calmodulin kinase II activity in cultured rat cortical neurons. In: *Stroke* 24 (2), 271–7; discussion 277–8. DOI: 10.1161/01.str.24.2.271.
- Clark, Benjamin J.; Simmons, Christine M.; Berkowitz, Laura E.; Wilber, Aaron A. (2018): The retrosplenial-parietal network and reference frame coordination for spatial navigation. In: *Behavioral neuroscience* 132 (5), S. 416–429. DOI: 10.1037/bne0000260.
- Clelland, C. D.; Choi, M.; Romberg, C.; Clemenson, G. D.; Fragniere, A.; Tyers, P. et al. (2009): A Functional Role for Adult Hippocampal Neurogenesis in Spatial Pattern Separation. In: *Science (New York, N.Y.)* 325 (5937), S. 210–213. DOI: 10.1126/science.1173215.
- Collingridge, G. L.; Singer, W. (1990): Excitatory amino acid receptors and synaptic plasticity. In: *Trends in pharmacological sciences* 11 (7), S. 290–296. DOI: 10.1016/0165-6147(90)90011-v.
- Conti, Luciano; Pollard, Steven M.; Gorba, Thorsten; Reitano, Erika; Toselli, Mauro; Biella, Gerardo et al. (2005): Niche-independent symmetrical self-renewal of a mammalian tissue stem cell. In: *PLoS biology* 3 (9), e283. DOI: 10.1371/journal.pbio.0030283.
- Cooper, A. J.; Kristal, B. S. (1997): Multiple roles of glutathione in the central nervous system. In: *Biological chemistry* 378 (8), S. 793–802.
- Cotman, C. W.; Monaghan, D. T.; Ganong, A. H. (1988): Excitatory amino acid neurotransmission: NMDA receptors and Hebb-type synaptic plasticity. In: *Annual Review of Neuroscience* 11, S. 61–80. DOI: 10.1146/annurev.ne.11.030188.000425.
- Couillard-Despres, Sebastien; Winner, Beate; Schaubeck, Susanne; Aigner, Robert; Vroemen, Maurice; Weidner, Norbert et al. (2005): Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. In: *The European journal of neuroscience* 21 (1), S. 1–14. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2004.03813.x.
- Coulter, Douglas A.; Steinhäuser, Christian (2015): Role of astrocytes in epilepsy. In: *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 5 (3), a022434. DOI: 10.1101/cshperspect.a022434.
- Cowan, W. M. (1979): The development of the brain. In: *Scientific American* 241 (3), S. 113–133.
- Cravens, R. W. (1974): Effects of maternal undernutrition on offspring behavior: incentive value of a food reward and ability to escape from water. In: *Developmental psychobiology* 7 (1), S. 61–69. DOI: 10.1002/dev.420070110.
- Crawford, T. O. (1998): Ataxia telangiectasia. In: *Seminars in pediatric neurology* 5 (4), S. 287–294. DOI: 10.1016/s1071-9091(98)80007-7.

- Creer, David J.; Romberg, Carola; Saksida, Lisa M.; van Praag, Henriette; Bussey, Timothy J. (2010): Running enhances spatial pattern separation in mice. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (5), S. 2367–2372. DOI: 10.1073/pnas.0911725107.
- Crossen, J. R.; Garwood, D.; Glatstein, E.; Neuwelt, E. A. (1994): Neurobehavioral sequelae of cranial irradiation in adults: a review of radiation-induced encephalopathy. In: *Journal of Clinical Oncology* 12 (3), S. 627–642. DOI: 10.1200/JCO.1994.12.3.627.
- Crowe, Samantha L.; Movsesyan, Vilen A.; Jorgensen, Timothy J.; Kondratyev, Alexei (2006): Rapid phosphorylation of histone H2A.X following ionotropic glutamate receptor activation. In: *The European journal of neuroscience* 23 (9), S. 2351–2361. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2006.04768.x.
- Danjo, Teruko (2020): Allocentric representations of space in the hippocampus. In: *Neuroscience research* 153, S. 1–7. DOI: 10.1016/j.neures.2019.06.002.
- Davis, Anthony J.; Chen, Benjamin P. C.; Chen, David J. (2014): DNA-PK: a dynamic enzyme in a versatile DSB repair pathway. In: *DNA repair* 17, S. 21–29. DOI: 10.1016/j.dnarep.2014.02.020.
- Deisseroth, Karl; Mermelstein, Paul G.; Xia, Houhui; Tsien, Richard W. (2003): Signaling from synapse to nucleus: the logic behind the mechanisms. In: *Current Opinion in Neurobiology* 13 (3), S. 354–365. DOI: 10.1016/S0959-4388(03)00076-X.
- Deng, Wei; Aimone, James B.; Gage, Fred H. (2010): New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? In: *Nature reviews. Neuroscience* 11 (5), S. 339–350. DOI: 10.1038/nrn2822.
- Desagher, S.; Glowinski, J.; Premont, J. (1996): Astrocytes protect neurons from hydrogen peroxide toxicity. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16 (8), S. 2553–2562.
- Devi, P. U.; Baskar, R.; Hande, M. P. (1994): Effect of exposure to low-dose gamma radiation during late organogenesis in the mouse fetus. In: *Radiation research* 138 (1), S. 133–138.
- D'Hooge, R.; Deyn, P. P. de (2001): Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. In: *Brain research. Brain research reviews* 36 (1), S. 60–90. DOI: 10.1016/S0165-0173(01)00067-4.
- Djukic, Biljana; Casper, Kristen B.; Philpot, Benjamin D.; Chin, Lih-Shen; McCarthy, Ken D. (2007): Conditional knock-out of Kir4.1 leads to glial membrane depolarization, inhibition of potassium and glutamate uptake, and enhanced short-term synaptic potentiation. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27 (42), S. 11354–11365. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0723-07.2007.
- Dobbing, John; Sands, Jean (1979): Comparative aspects of the brain growth spurt. In: *Early Human Development* 3 (1), S. 79–83. DOI: 10.1016/0378-3782(79)90022-7.
- Doetsch, Fiona (2003): The glial identity of neural stem cells. In: *Nature neuroscience* 6 (11), S. 1127–1134. DOI: 10.1038/nn1144.
- Downs, Jessica A.; Jackson, Stephen P. (2004): A means to a DNA end: the many roles of Ku. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 5 (5), S. 367–378. DOI: 10.1038/nrm1367.
- Dowsett, Mitch; Nielsen, Torsten O.; A'Hern, Roger; Bartlett, John; Coombes, R. Charles; Cuzick, Jack et al. (2011): Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group. In: *Journal of the National Cancer Institute* 103 (22), S. 1656–1664. DOI: 10.1093/jnci/djr393.
- Drake, F. H.; Hofmann, G. A.; Mong, S. M.; Bartus, J. O.; Hertzberg, R. P.; Johnson, R. K. et al. (1989): In vitro and intracellular inhibition of topoisomerase II by the antitumor agent merbarone. In: *Cancer research* 49 (10), S. 2578–2583.
- Dringen, R. (2000): Metabolism and functions of glutathione in brain. In: *Progress in Neurobiology* 62 (6), S. 649–671. DOI: 10.1016/S0301-0082(99)00060-X.
- Dringen, R.; Hamprecht, B. (1997): Involvement of glutathione peroxidase and catalase in the disposal of exogenous hydrogen peroxide by cultured astroglial cells. In: *Brain Research* 759 (1), S. 67–75. DOI: 10.1016/S0006-8993(97)00233-3.
- Dringen, R.; Kussmaul, L.; Gutterer, J. M.; Hirrlinger, J.; Hamprecht, B. (1999): The glutathione system of peroxide detoxification is less efficient in neurons than in astroglial cells. In: *Journal of neurochemistry* 72 (6), S. 2523–2530. DOI: 10.1046/j.1471-4159.1999.0722523.x.
- Dringen, R.; Kussmaul, L.; Hamprecht, B. (1998): Rapid clearance of tertiary butyl hydroperoxide by cultured astroglial cells via oxidation of glutathione. In: *Glia* 23 (2), S. 139–145. DOI: 10.1002/(sici)1098-1136(199806)23:2<139::aid-glia5>3.0.co;2-1.
- Duan, Xin; Kang, Eunhai; Liu, Cindy Y.; Ming, Guo-li; Song, Hongjun (2008): Development of neural stem cell in the adult brain. In: *Current Opinion in Neurobiology* 18 (1), S. 108–115. DOI: 10.1016/j.conb.2008.04.001.
- DUNHAM, N. W.; MIYA, T. S. (1957): A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. In: *Journal of the American Pharmaceutical Association. American Pharmaceutical Association* 46 (3), S. 208–209. DOI: 10.1002/jps.3030460322.
- Dupret, David; Revest, Jean-Michel; Koehl, Muriel; Ichas, François; Giorgi, Francesca de; Costet, Pierre et al. (2008): Spatial relational memory requires hippocampal adult neurogenesis. In: *PLoS one* 3 (4), e1959. DOI: 10.1371/journal.pone.0001959.
- Eichenbaum, H.; Stewart, C.; Morris, R. G. (1990): Hippocampal representation in place learning. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 10 (11), S. 3531–3542. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.10-11-03531.1990.
- Eichenbaum, Howard (2004): Hippocampus: cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory. In: *Neuron* 44 (1), S. 109–120. DOI: 10.1016/j.neuron.2004.08.028.

- Eichenbaum, Howard (2015): The Hippocampus as a Cognitive Map ... of Social Space. In: *Neuron* 87 (1), S. 9–11. DOI: 10.1016/j.neuron.2015.06.013.
- Enkvist, M. O.; Holopainen, I.; Akerman, K. E. (1989): Glutamate receptor-linked changes in membrane potential and intracellular Ca²⁺ in primary rat astrocytes. In: *Glia* 2 (6), S. 397–402. DOI: 10.1002/glia.440020602.
- Erecinska, M. (1990): Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. In: *Progress in Neurobiology* 35 (4), S. 245–296. DOI: 10.1016/0301-0082(90)90013-7.
- Eriksson, P. (1997): Developmental neurotoxicity of environmental agents in the neonate. In: *Neurotoxicology* 18 (3), S. 719–726.
- Eriksson, P. S.; Perfilieva, E.; Björk-Eriksson, T.; Alborn, A. M.; Nordborg, C.; Peterson, D. A.; Gage, F. H. (1998): Neurogenesis in the adult human hippocampus. In: *Nature medicine* 4 (11), S. 1313–1317. DOI: 10.1038/3305.
- Eriksson, Per; Buratovic, Sonja; Fredriksson, Anders; Stenelöw, Bo; Sundell-Bergman, Synnöve (2016): Neonatal exposure to whole body ionizing radiation induces adult neurobehavioural defects: Critical period, dose--response effects and strain and sex comparison. In: *Behavioural Brain Research* 304, S. 11–19. DOI: 10.1016/j.bbr.2016.02.008.
- Escribano-Díaz, Cristina; Orthwein, Alexandre; Fradet-Turcotte, Amélie; Xing, Mengtan; Young, Jordan T. F.; Tkáč, Ján et al. (2013): A cell cycle-dependent regulatory circuit composed of 53BP1-RIF1 and BRCA1-CtIP controls DNA repair pathway choice. In: *Molecular cell* 49 (5), S. 872–883. DOI: 10.1016/j.molcel.2013.01.001.
- Espósito, M. Soledad; Piatti, Verónica C.; Laplagne, Diego A.; Morgenstern, Nicolás A.; Ferrari, Carina C.; Pitossi, Fernando J.; Schinder, Alejandro F. (2005): Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25 (44), S. 10074–10086. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3114-05.2005.
- Essers, J.; Hendriks, R. W.; Swagemakers, S. M.; Troelstra, C.; Wit, J. de; Bootsma, D. et al. (1997): Disruption of mouse RAD54 reduces ionizing radiation resistance and homologous recombination. In: *Cell* 89 (2), S. 195–204.
- Essers, J.; van Steeg, H.; Wit, J. de; Swagemakers, S. M.; Vermeij, M.; Hoeijmakers, J. H.; Kanaar, R. (2000): Homologous and non-homologous recombination differentially affect DNA damage repair in mice. In: *The EMBO journal* 19 (7), S. 1703–1710. DOI: 10.1093/emboj/19.7.1703.
- Fahimian, Benjamin P.; Mao, Yu; Cloetens, Peter; Miao, Jianwei (2010): Low-dose x-ray phase-contrast and absorption CT using equally sloped tomography. In: *Physics in medicine and biology* 55 (18), S. 5383–5400. DOI: 10.1088/0031-9155/55/18/008.
- Fahimian, Benjamin P.; Zhao, Yunzhe; Huang, Zhifeng; Fung, Russell; Mao, Yu; Zhu, Chun et al. (2013): Radiation dose reduction in medical x-ray CT via Fourier-based iterative reconstruction. In: *Medical physics* 40 (3), S. 31914. DOI: 10.1118/1.4791644.
- Falck, Jacob; Coates, Julia; Jackson, Stephen P. (2005): Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. In: *Nature* 434 (7033), S. 605–611. DOI: 10.1038/nature03442.
- Fan, Yang; Liu, Zhengyan; Weinstein, Philip R.; Fike, John R.; Liu, Jialing (2007): Environmental enrichment enhances neurogenesis and improves functional outcome after cranial irradiation. In: *The European journal of neuroscience* 25 (1), S. 38–46. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2006.05269.x.
- Fancy, Stephen P. J.; Chan, Jonah R.; Baranzini, Sergio E.; Franklin, Robin J. M.; Rowitch, David H. (2011): Myelin regeneration: a recapitulation of development? In: *Annual Review of Neuroscience* 34, S. 21–43. DOI: 10.1146/annurev-neuro-061010-113629.
- Fares, Jawad; Bou Diab, Zeina; Nabha, Sanaa; Fares, Youssef (2019): Neurogenesis in the adult hippocampus: history, regulation, and prospective roles. In: *The International journal of neuroscience* 129 (6), S. 598–611. DOI: 10.1080/00207454.2018.1545771.
- Featherstone, Carol; Jackson, Stephen P. (1999): DNA double-strand break repair. In: *Current biology : CB* 9 (20), R759-R761. DOI: 10.1016/S0960-9822(00)80005-6.
- Feng, Lin; Fong, Ka-Wing; Wang, Jiadong; Wang, Wenqi; Chen, Junjie (2013): RIF1 counteracts BRCA1-mediated end resection during DNA repair. In: *The Journal of biological chemistry* 288 (16), S. 11135–11143. DOI: 10.1074/jbc.M113.457440.
- Ferguson, Susan M.; Fasano, Stefania; Yang, Pengwei; Brambilla, Riccardo; Robinson, Terry E. (2006): Knockout of ERK1 enhances cocaine-evoked immediate early gene expression and behavioral plasticity. In: *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 31 (12), S. 2660–2668. DOI: 10.1038/sj.npp.1301014.
- Ferman, Tanis J.; Boeve, Bradley F. (2007): Dementia with Lewy bodies. In: *Neurologic clinics* 25 (3), 741-60, vii. DOI: 10.1016/j.ncl.2007.03.001.
- Fernandes-Alnemri, T.; Litwack, G.; Alnemri, E. S. (1994): CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. In: *The Journal of biological chemistry* 269 (49), S. 30761–30764.
- Fike, John R.; Rosi, Susanna; Limoli, Charles L. (2009): Neural precursor cells and central nervous system radiation sensitivity. In: *Seminars in radiation oncology* 19 (2), S. 122–132. DOI: 10.1016/j.semradonc.2008.12.003.
- Fishel, Melissa L.; Vasko, Michael R.; Kelley, Mark R. (2007): DNA repair in neurons: so if they don't divide what's to repair? In: *Mutation research* 614 (1-2), S. 24–36. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2006.06.007.
- Fortune, J. M.; Osherooff, N. (1998): Merbarone inhibits the catalytic activity of human topoisomerase IIalpha by blocking DNA cleavage. In: *The Journal of biological chemistry* 273 (28), S. 17643–17650. DOI: 10.1074/jbc.273.28.17643.

- Freeman, Marc R. (2010): Specification and morphogenesis of astrocytes. In: *Science (New York, N.Y.)* 330 (6005), S. 774–778. DOI: 10.1126/science.1190928.
- Freund, T. F.; Buzsáki, G. (1996): Interneurons of the hippocampus. In: *Hippocampus* 6 (4), S. 347–470. DOI: 10.1002/(SICI)1098-1063(1996)6:4<347::AID-HIPO1>3.0.CO;2-I.
- Frey, U.; Morris, R. G. (1997): Synaptic tagging and long-term potentiation. In: *Nature* 385 (6616), S. 533–536. DOI: 10.1038/385533a0.
- Fu, Hui; Cai, Jun; Clevers, Hans; Fast, Eva; Gray, Susan; Greenberg, Rachel et al. (2009): A genome-wide screen for spatially restricted expression patterns identifies transcription factors that regulate glial development. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29 (36), S. 11399–11408. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0160-09.2009.
- Fyhn, Marianne; Molden, Sturla; Witter, Menno P.; Moser, Edvard I.; Moser, May-Britt (2004): Spatial representation in the entorhinal cortex. In: *Science (New York, N.Y.)* 305 (5688), S. 1258–1264. DOI: 10.1126/science.1099901.
- Gage, F. H. (2000): Mammalian neural stem cells. In: *Science (New York, N.Y.)* 287 (5457), S. 1433–1438. DOI: 10.1126/science.287.5457.1433.
- Gallegos, David A.; Chan, Urann; Chen, Liang-Fu; West, Anne E. (2018): Chromatin Regulation of Neuronal Maturation and Plasticity. In: *Trends in Neurosciences* 41 (5), S. 311–324. DOI: 10.1016/j.tins.2018.02.009.
- Gallo, Francisco T.; Katche, Cynthia; Morici, Juan F.; Medina, Jorge H.; Weisstaub, Noelia V. (2018): Immediate Early Genes, Memory and Psychiatric Disorders: Focus on c-Fos, Egr1 and Arc. In: *Frontiers in behavioral neuroscience* 12, S. 79. DOI: 10.3389/fnbeh.2018.00079.
- Gao, Ming; Sossa, Kenneth; Song, Lihua; Errington, Lauren; Cummings, Laurel; Hwang, Hongik et al. (2010): A specific requirement of Arc/Arg3.1 for visual experience-induced homeostatic synaptic plasticity in mouse primary visual cortex. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30 (21), S. 7168–7178. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1067-10.2010.
- Garthe, Alexander; Behr, Joachim; Kempermann, Gerd (2009): Adult-generated hippocampal neurons allow the flexible use of spatially precise learning strategies. In: *PLoS one* 4 (5), e5464. DOI: 10.1371/journal.pone.0005464.
- Gatz, Susanne A.; Ju, Limei; Gruber, Ralph; Hoffmann, Eva; Carr, Antony M.; Wang, Zhao-Qi et al. (2011): Requirement for DNA ligase IV during embryonic neuronal development. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31 (27), S. 10088–10100. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1324-11.2011.
- Ge, Shaoyu; Goh, Eyleen L. K.; Sailor, Kurt A.; Kitabatake, Yasuji; Ming, Guo-li; Song, Hongjun (2006): GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. In: *Nature* 439 (7076), S. 589–593. DOI: 10.1038/nature04404.
- Ge, Shaoyu; Sailor, Kurt A.; Ming, Guo-li; Song, Hongjun (2008): Synaptic integration and plasticity of new neurons in the adult hippocampus. In: *The Journal of physiology* 586 (16), S. 3759–3765. DOI: 10.1113/jphysiol.2008.155655.
- Ge, Shaoyu; Yang, Chih-Hao; Hsu, Kuei-Sen; Ming, Guo-li; Song, Hongjun (2007): A critical period for enhanced synaptic plasticity in newly generated neurons of the adult brain. In: *Neuron* 54 (4), S. 559–566. DOI: 10.1016/j.neuron.2007.05.002.
- Gerdes, J.; Lemke, H.; Baisch, H.; Wacker, H. H.; Schwab, U.; Stein, H. (1984): Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 133 (4), S. 1710–1715.
- Gerdes, J.; Li, L.; Schlueter, C.; Duchrow, M.; Wohlenberg, C.; Gerlach, C. et al. (1991): Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. In: *The American journal of pathology* 138 (4), S. 867–873.
- Gillessen, Thomas; Budd, Samantha L.; Lipton, Stuart A. (2002): Excitatory amino acid neurotoxicity. In: *Advances in experimental medicine and biology* 513, S. 3–40. DOI: 10.1007/978-1-4615-0123-7_1.
- Gladding, Clare M.; Raymond, Lynn A. (2011): Mechanisms underlying NMDA receptor synaptic/extrasynaptic distribution and function. In: *Molecular and cellular neurosciences* 48 (4), S. 308–320. DOI: 10.1016/j.mcn.2011.05.001.
- Glover, A.; Chun, H. G.; Kleinman, L. M.; Cooney, D. A.; Plowman, J.; Grieshaber, C. K. et al. (1987): Merbarone: an antitumor agent entering clinical trials. In: *Investigational new drugs* 5 (2), S. 137–143. DOI: 10.1007/BF00203538.
- Gobbel, G. T.; Bellinzona, M.; Vogt, A. R.; Gupta, N.; Fike, J. R.; Chan, P. H. (1998): Response of postmitotic neurons to X-irradiation: implications for the role of DNA damage in neuronal apoptosis. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18 (1), S. 147–155.
- Goffinet, Andre M. (2018): Neocortical development. In: *Seminars in cell & developmental biology* 76, S. 1–2. DOI: 10.1016/j.semcdb.2017.10.002.
- Gonçalves, J. Tiago; Schafer, Simon T.; Gage, Fred H. (2016): Adult Neurogenesis in the Hippocampus: From Stem Cells to Behavior. In: *Cell* 167 (4), S. 897–914. DOI: 10.1016/j.cell.2016.10.021.
- Gonzalez-Perez, Oscar; Quiñones-Hinojosa, Alfredo (2012): Astrocytes as neural stem cells in the adult brain. In: *Journal of stem cells* 7 (3), S. 181–188.
- Goodhead, D. T. (1994): Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA. In: *International journal of radiation biology* 65 (1), S. 7–17. DOI: 10.1080/09553009414550021.
- Götz, Magdalena; Huttner, Wieland B. (2005): The cell biology of neurogenesis. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 6 (10), S. 777–788. DOI: 10.1038/nrm1739.

- Gould, E.; Reeves, A. J.; Fallah, M.; Tanapat, P.; Gross, C. G.; Fuchs, E. (1999a): Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (9), S. 5263–5267. DOI: 10.1073/pnas.96.9.5263.
- Gould, E.; Reeves, A. J.; Graziano, M. S.; Gross, C. G. (1999b): Neurogenesis in the neocortex of adult primates. In: *Science (New York, N.Y.)* 286 (5439), S. 548–552. DOI: 10.1126/science.286.5439.548.
- Grawunder, U.; Wilm, M.; Wu, X.; Kulesza, P.; Wilson, T. E.; Mann, M.; Lieber, M. R. (1997): Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells. In: *Nature* 388 (6641), S. 492–495. DOI: 10.1038/41358.
- Graziano, Alessandro; Petrosini, Laura; Bartoletti, Alessandro (2003): Automatic recognition of explorative strategies in the Morris water maze. In: *Journal of neuroscience methods* 130 (1), S. 33–44. DOI: 10.1016/S0165-0270(03)00187-0.
- Guéguen, Yann; Bontemps, Alice; Ebrahimian, Teni G. (2019): Adaptive responses to low doses of radiation or chemicals: their cellular and molecular mechanisms. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 76 (7), S. 1255–1273. DOI: 10.1007/s00018-018-2987-5.
- Guzowski, J. F.; Lyford, G. L.; Stevenson, G. D.; Houston, F. P.; McGaugh, J. L.; Worley, P. F.; Barnes, C. A. (2000): Inhibition of activity-dependent arc protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20 (11), S. 3993–4001.
- Haas, S.; Kaina, B. (1995): c-Fos is involved in the cellular defence against the genotoxic effect of UV radiation. In: *Carcinogenesis* 16 (5), S. 985–991. DOI: 10.1093/carcin/16.5.985.
- Hafting, Torkel; Fyhn, Marianne; Molden, Sturla; Moser, May-Britt; Moser, Edvard I. (2005): Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. In: *Nature* 436 (7052), S. 801–806. DOI: 10.1038/nature03721.
- Hall, Per; Adami, Hans-Olov; Trichopoulos, Dimitrios; Pedersen, Nancy L.; Lagiou, Pagona; Ekblom, Anders et al. (2004): Effect of low doses of ionising radiation in infancy on cognitive function in adulthood: Swedish population based cohort study. In: *BMJ (Clinical research ed.)* 328 (7430), S. 19. DOI: 10.1136/bmj.328.7430.19.
- Hamm, R. J.; Pike, B. R.; O'Dell, D. M.; Lyeth, B. G.; Jenkins, L. W. (1994): The rotarod test: an evaluation of its effectiveness in assessing motor deficits following traumatic brain injury. In: *Journal of neurotrauma* 11 (2), S. 187–196. DOI: 10.1089/neu.1994.11.187.
- Hanif, Adam M.; Lawson, Eric C.; Prunty, Megan; Gogniat, Marissa; Aung, Moe H.; Chakraborty, Ranjay et al. (2015): Neuroprotective Effects of Voluntary Exercise in an Inherited Retinal Degeneration Mouse Model. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 56 (11), S. 6839–6846. DOI: 10.1167/iovs.15-16792.
- Harada, Akihiro; Teng, Junlin; Takei, Yosuke; Oguchi, Keiko; Hirokawa, Nobutaka (2002): MAP2 is required for dendrite elongation, PKA anchoring in dendrites, and proper PKA signal transduction. In: *The Journal of cell biology* 158 (3), S. 541–549. DOI: 10.1083/jcb.200110134.
- Hardingham, G. E.; Fukunaga, Y.; Bading, H. (2002): Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. In: *Nature neuroscience* 5 (5), S. 405–414. DOI: 10.1038/nn835.
- Hargreaves, Eric L.; Rao, Geeta; Lee, Inah; Knierim, James J. (2005): Major dissociation between medial and lateral entorhinal input to dorsal hippocampus. In: *Science (New York, N.Y.)* 308 (5729), S. 1792–1794. DOI: 10.1126/science.1110449.
- Hartwell, L. H.; Weinert, T. A. (1989): Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. In: *Science (New York, N.Y.)* 246 (4930), S. 629–634. DOI: 10.1126/science.2683079.
- HAYASHI, T. (1952): A physiological study of epileptic seizures following cortical stimulation in animals and its application to human clinics. In: *The Japanese journal of physiology* 3 (1), S. 46–64.
- Henson, Maile A.; Roberts, Adam C.; Salimi, Kayvon; Vadlamudi, Swarooparani; Hamer, Robert M.; Gilmore, John H. et al. (2008): Developmental regulation of the NMDA receptor subunits, NR3A and NR1, in human prefrontal cortex. In: *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)* 18 (11), S. 2560–2573. DOI: 10.1093/cercor/bhn017.
- Hertz, Leif (2006): Glutamate, a neurotransmitter--and so much more. A synopsis of Wierzba III. In: *Neurochemistry international* 48 (6-7), S. 416–425. DOI: 10.1016/j.neuint.2005.12.021.
- Higuchi, M.; Maas, S.; Single, F. N.; Hartner, J.; Rozov, A.; Burnashev, N. et al. (2000): Point mutation in an AMPA receptor gene rescues lethality in mice deficient in the RNA-editing enzyme ADAR2. In: *Nature* 406 (6791), S. 78–81. DOI: 10.1038/35017558.
- Hinnell, Claire; Hurt, Catherine S.; Landau, Sabine; Brown, Richard G.; Samuel, Michael (2012): Nonmotor versus motor symptoms: how much do they matter to health status in Parkinson's disease? In: *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 27 (2), S. 236–241. DOI: 10.1002/mds.23961.
- Hirasawa, Takae; Wada, Hidenori; Kohsaka, Shinichi; Uchino, Shigeo (2003): Inhibition of NMDA receptors induces delayed neuronal maturation and sustained proliferation of progenitor cells during neocortical development. In: *J. Neurosci. Res.* 74 (5), S. 676–687. DOI: 10.1002/jnr.10795.
- Hochgerner, Hannah; Zeisel, Amit; Lönnerberg, Peter; Linnarsson, Sten (2018): Conserved properties of dentate gyrus neurogenesis across postnatal development revealed by single-cell RNA sequencing. In: *Nature neuroscience* 21 (2), S. 290–299. DOI: 10.1038/s41593-017-0056-2.
- Hockfield, S.; McKay, R. D. (1985): Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 5 (12), S. 3310–3328.
- Hodges, Helen; Katzung, Nicole; Sowinski, Peter; Hopewell, John W.; Wilkinson, John H.; Bywaters, Tony; Rezvani, Mohi (1998): Late behavioural and neuropathological effects of local brain irradiation in the rat. In: *Behavioural Brain Research* 91 (1-2), S. 99–114. DOI: 10.1016/S0166-4328(97)00108-3.

- Hollmann, Michael; O'Shea-Greenfield, Anne; Rogers, Scott W.; Heinemann, Stephen (1989): Cloning by functional expression of a member of the glutamate receptor family. In: *Nature* 342 (6250), S. 643–648. DOI: 10.1038/342643a0.
- Huettnner, J. E.; Bean, B. P. (1988): Block of N-methyl-D-aspartate-activated current by the anticonvulsant MK-801: selective binding to open channels. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85 (4), S. 1307–1311. DOI: 10.1073/pnas.85.4.1307.
- Izant, J. G.; McIntosh, J. R. (1980): Microtubule-associated proteins: a monoclonal antibody to MAP2 binds to differentiated neurons. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77 (8), S. 4741–4745. DOI: 10.1073/pnas.77.8.4741.
- Jackson, Stephen P. (2002): Sensing and repairing DNA double-strand breaks. In: *Carcinogenesis* 23 (5), S. 687–696. DOI: 10.1093/carcin/23.5.687.
- Jackson, Stephen P.; Bartek, Jiri (2009): The DNA-damage response in human biology and disease. In: *Nature* 461 (7267), S. 1071–1078. DOI: 10.1038/nature08467.
- Jahn, Olaf; Tenzer, Stefan; Werner, Hauke B. (2009): Myelin proteomics: molecular anatomy of an insulating sheath. In: *Molecular neurobiology* 40 (1), S. 55–72. DOI: 10.1007/s12035-009-8071-2.
- Jani, Ashish; Shaikh, Fauzia; Barton, Sunjay; Willis, Callen; Banerjee, Debarshi; Mitchell, Jason et al. (2016): High-Dose, Single-Fraction Irradiation Rapidly Reduces Tumor Vasculature and Perfusion in a Xenograft Model of Neuroblastoma. In: *International journal of radiation oncology, biology, physics* 94 (5), S. 1173–1180. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2015.12.367.
- Jansson, Linda C.; Åkerman, Karl E. (2014): The role of glutamate and its receptors in the proliferation, migration, differentiation and survival of neural progenitor cells. In: *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)* 121 (8), S. 819–836. DOI: 10.1007/s00702-014-1174-6.
- Johnson, J. W.; Ascher, P. (1987): Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. In: *Nature* 325 (6104), S. 529–531. DOI: 10.1038/325529a0.
- Jones, M. W.; Errington, M. L.; French, P. J.; Fine, A.; Bliss, T. V.; Garel, S. et al. (2001): A requirement for the immediate early gene Zif268 in the expression of late LTP and long-term memories. In: *Nature neuroscience* 4 (3), S. 289–296. DOI: 10.1038/85138.
- Ju, Bong-Gun; Lunyak, Victoria V.; Perissi, Valentina; Garcia-Bassets, Ivan; Rose, David W.; Glass, Christopher K.; Rosenfeld, Michael G. (2006): A topoisomerase II β -mediated dsDNA break required for regulated transcription. In: *Science (New York, N.Y.)* 312 (5781), S. 1798–1802. DOI: 10.1126/science.1127196.
- Kaczmarek, L.; Nikołajew, E. (1990): c-fos protooncogene expression and neuronal plasticity. In: *Acta neurobiologiae experimentalis* 50 (4-5), S. 173–179.
- Kalcheva, N.; Rockwood, J. M.; Kress, Y.; Steiner, A.; Shafit-Zagardo, B. (1998): Molecular and functional characteristics of MAP-2a: ability of MAP-2a versus MAP-2b to induce stable microtubules in COS cells. In: *Cell motility and the cytoskeleton* 40 (3), S. 272–285. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0169(1998)40:3<272::AID-CM6>3.0.CO;2-F.
- Kalwy, S. A.; Smith, R. (1994): Mechanisms of myelin basic protein and proteolipid protein targeting in oligodendrocytes (review). In: *Molecular membrane biology* 11 (2), S. 67–78. DOI: 10.3109/09687689409162223.
- Kanaar, R.; Hoeijmakers, J. H.; van Gent, D. C. (1998): Molecular mechanisms of DNA double strand break repair. In: *Trends in cell biology* 8 (12), S. 483–489. DOI: 10.1016/s0962-8924(98)01383-x.
- Kaneko, Naoko; Sawada, Masato; Sawamoto, Kazunobu (2017): Mechanisms of neuronal migration in the adult brain. In: *Journal of neurochemistry* 141 (6), S. 835–847. DOI: 10.1111/jnc.14002.
- Kao, Fang-Chi; Su, San-Hua; Carlson, Gregory C.; Liao, Wenlin (2015): MeCP2-mediated alterations of striatal features accompany psychomotor deficits in a mouse model of Rett syndrome. In: *Brain structure & function* 220 (1), S. 419–434. DOI: 10.1007/s00429-013-0664-x.
- Kao, Gary D.; McKenna, W. Gillies; Guenther, Matthew G.; Muschel, Ruth J.; Lazar, Mitchell A.; Yen, Tim J. (2003): Histone deacetylase 4 interacts with 53BP1 to mediate the DNA damage response. In: *The Journal of cell biology* 160 (7), S. 1017–1027. DOI: 10.1083/jcb.200209065.
- Kapitein, Lukas C.; Hoogenraad, Casper C. (2015): Building the Neuronal Microtubule Cytoskeleton. In: *Neuron* 87 (3), S. 492–506. DOI: 10.1016/j.neuron.2015.05.046.
- Kaplan, M. S. (1985): Formation and turnover of neurons in young and senescent animals: an electronmicroscopic and morphometric analysis. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 457, S. 173–192. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1985.tb20805.x.
- Kaplan, M. S.; Hinds, J. W. (1977): Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. In: *Science (New York, N.Y.)* 197 (4308), S. 1092–1094. DOI: 10.1126/science.887941.
- Káradóttir, Ragnhildur; Cavelier, Pauline; Bergersen, Linda H.; Attwell, David (2005): NMDA receptors are expressed in oligodendrocytes and activated in ischaemia. In: *Nature* 438 (7071), S. 1162–1166. DOI: 10.1038/nature04302.
- Karakas, Erkan; Furukawa, Hiro (2014): Crystal structure of a heterotetrameric NMDA receptor ion channel. In: *Science (New York, N.Y.)* 344 (6187), S. 992–997. DOI: 10.1126/science.1251915.
- Kato, H. (1971): Mortality in children exposed to the A-bombs while in utero, 1945–1969. In: *American journal of epidemiology* 93 (6), S. 435–442. DOI: 10.1093/oxfordjournals.aje.a121277.

- Katsuki, Hiroshi; Shibata, Haruki; Takenaka, Chikako; Kume, Toshiaki; Kaneko, Shuji; Akaike, Akinori (2003): N-Methyl-D-aspartate receptors contribute to the maintenance of dopaminergic neurons in rat midbrain slice cultures. In: *Neuroscience letters* 341 (2), S. 123–126. DOI: 10.1016/s0304-3940(03)00176-9.
- Katsuki, Yoko; Takata, Minoru (2016): Defects in homologous recombination repair behind the human diseases: FA and HBOC. In: *Endocrine-related cancer* 23 (10), T19-37. DOI: 10.1530/ERC-16-0221.
- Kayama, Tasuku; Suzuki, Ikuro; Odawara, Aoi; Sasaki, Takuya; Ikegaya, Yuji (2018): Temporally coordinated spiking activity of human induced pluripotent stem cell-derived neurons co-cultured with astrocytes. In: *Biochemical and biophysical research communications* 495 (1), S. 1028–1033. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.11.115.
- Kee, Nohjin; Teixeira, Cátia M.; Wang, Afra H.; Frankland, Paul W. (2007): Preferential incorporation of adult-generated granule cells into spatial memory networks in the dentate gyrus. In: *Nature neuroscience* 10 (3), S. 355–362. DOI: 10.1038/nn1847.
- Kempf, Stefan J.; Moertl, Simone; Sepe, Sara; Toerne, Christine von; Hauck, Stefanie M.; Atkinson, Michael J. et al. (2015): Low-dose ionizing radiation rapidly affects mitochondrial and synaptic signaling pathways in murine hippocampus and cortex. In: *Journal of proteome research* 14 (5), S. 2055–2064. DOI: 10.1021/acs.jproteome.5b00114.
- Kerstin Rau (2018): Impact of ionising radiation on adult neurogenesis: physiological and cellular effects of low and moderate doses of ionising radiation in neural differentiation distinguished by differentiation phase. Technische Universität, Darmstadt. Online verfügbar unter <http://tuprints.ulb.tu-darmstadt.de/7391/>.
- Khanna, K. K.; Jackson, S. P. (2001): DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. In: *Nature genetics* 27 (3), S. 247–254. DOI: 10.1038/85798.
- Khelifa, T.; Beck, W. T. (1999): Merbarone, a catalytic inhibitor of DNA topoisomerase II, induces apoptosis in CEM cells through activation of ICE/CED-3-like protease. In: *Molecular pharmacology* 55 (3), S. 548–556.
- Kim, In-Gyu; Lee, Yun-Sil Lee (2003): Radiation-induced tumorigenesis. In: *Journal of biochemistry and molecular biology* 36 (1), S. 144–148. DOI: 10.5483/bmbrep.2003.36.1.144.
- Kim, Perry M.; Paffett, Kimberly S.; Solinger, Jachen A.; Heyer, Wolf-Dietrich; Nickoloff, Jac A. (2002): Spontaneous and double-strand break-induced recombination, and gene conversion tract lengths, are differentially affected by overexpression of wild-type or ATPase-defective yeast Rad54. In: *Nucleic acids research* 30 (13), S. 2727–2735. DOI: 10.1093/nar/gkf413.
- Kirshner, Michal; Rathavs, Moran; Nizan, Anat; Essers, Jeroen; Kanaar, Roland; Shiloh, Yosef; Barzilai, Ari (2009): Analysis of the relationships between ATM and the Rad54 paralogs involved in homologous recombination repair. In: *DNA repair* 8 (2), S. 253–261. DOI: 10.1016/j.dnarep.2008.11.005.
- Kooistra, R.; Pastink, A.; Zonneveld, J. B.; Lohman, P. H.; Eeken, J. C. (1999): The Drosophila melanogaster DmRAD54 gene plays a crucial role in double-strand break repair after P-element excision and acts synergistically with Ku70 in the repair of X-ray damage. In: *Molecular and cellular biology* 19 (9), S. 6269–6275. DOI: 10.1128/mcb.19.9.6269.
- Kovacic, Peter; Pozos, Robert S.; Somanathan, Ratnasamy; Shangari, Nandita; O'Brien, Peter J. (2005): Mechanism of mitochondrial uncouplers, inhibitors, and toxins: focus on electron transfer, free radicals, and structure-activity relationships. In: *Current medicinal chemistry* 12 (22), S. 2601–2623. DOI: 10.2174/092986705774370646.
- Krebs, Joachim (2007): Calcium. A Matter of Life or Death. 1. Aufl. Hg. v. Marek Michalak. s.l.: Elsevier professional (New comprehensive biochemistry, v. 41). Online verfügbar unter <http://site.ebrary.com/lib/alltitles/docDetail.action?docID=10190777>.
- Kriegstein, Arnold; Alvarez-Buylla, Arturo (2009): The Glial Nature of Embryonic and Adult Neural Stem Cells. In: *Annual Review of Neuroscience* 32 (1), S. 149–184. DOI: 10.1146/annurev.neuro.051508.135600.
- Kropff, Emilio; Carmichael, James E.; Moser, May-Britt; Moser, Edvard I. (2015): Speed cells in the medial entorhinal cortex. In: *Nature* 523 (7561), S. 419–424. DOI: 10.1038/nature14622.
- Kucukdereli, Hakan; Allen, Nicola J.; Lee, Anthony T.; Feng, Ava; Ozlu, M. Ilcim; Conatser, Laura M. et al. (2011): Control of excitatory CNS synaptogenesis by astrocyte-secreted proteins Hevin and SPARC. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (32), E440-9. DOI: 10.1073/pnas.1104977108.
- Kuffler, S. W. (1967): Neuroglial cells: physiological properties and a potassium mediated effect of neuronal activity on the glial membrane potential. In: *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 168 (1010), S. 1–21. DOI: 10.1098/rspb.1967.0047.
- Kuhn, H. G.; Dickinson-Anson, H.; Gage, F. H. (1996): Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16 (6), S. 2027–2033.
- Kuijpers, Marijn; Hoogenraad, Casper C. (2011): Centrosomes, microtubules and neuronal development. In: *Molecular and cellular neurosciences* 48 (4), S. 349–358. DOI: 10.1016/j.mcn.2011.05.004.
- Kulkarni, S. K.; Singh, K.; Bishnoi, M. (2007): Elevated zero maze: a paradigm to evaluate antianxiety effects of drugs. In: *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology* 29 (5), S. 343–348. DOI: 10.1358/mf.2007.29.5.1117557.
- Kuznetsov, Sergey G.; Haines, Diana C.; Martin, Betty K.; Sharan, Shyam K. (2009): Loss of Rad51c leads to embryonic lethality and modulation of Trp53-dependent tumorigenesis in mice. In: *Cancer research* 69 (3), S. 863–872. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3057.
- Lackinger, D.; Eichhorn, U.; Kaina, B. (2001): Effect of ultraviolet light, methyl methanesulfonate and ionizing radiation on the genotoxic response and apoptosis of mouse fibroblasts lacking c-Fos, p53 or both. In: *Mutagenesis* 16 (3), S. 233–241. DOI: 10.1093/mutage/16.3.233.

- Lalo, Ulyana; Pankratov, Yuri; KIRCHHOFF, FRANK; North, R. Alan; Verkhatsky, Alexei (2006): NMDA receptors mediate neuron-to-glia signaling in mouse cortical astrocytes. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26 (10), S. 2673–2683. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4689-05.2006.
- Lanahan, A.; Worley, P. (1998): Immediate-early genes and synaptic function. In: *Neurobiology of learning and memory* 70 (1-2), S. 37–43. DOI: 10.1006/nlme.1998.3836.
- Larsen, Brian Roland; Assentoft, Mette; Cotrina, Maria L.; Hua, Susan Z.; Nedergaard, Maiken; Kaila, Kai et al. (2014): Contributions of the Na⁺/K⁺-ATPase, NKCC1, and Kir4.1 to hippocampal K⁺ clearance and volume responses. In: *Glia* 62 (4), S. 608–622. DOI: 10.1002/glia.22629.
- Laura Trundle | Fusion Conferences: 2nd Neurogenesis Abstract Booklet.
- Lawson, Eric C.; Han, Moon K.; Sellers, Jana T.; Chrenek, Micah A.; Hanif, Adam; Gogniat, Marissa A. et al. (2014): Aerobic exercise protects retinal function and structure from light-induced retinal degeneration. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 34 (7), S. 2406–2412. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2062-13.2014.
- Lazebnik, Y. A.; Kaufmann, S. H.; Desnoyers, S.; Poirier, G. G.; Earnshaw, W. C. (1994): Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. In: *Nature* 371 (6495), S. 346–347. DOI: 10.1038/371346a0.
- Leandro-García, Luis J.; Leskelä, Susanna; Landa, Iñigo; Montero-Conde, Cristina; López-Jiménez, Elena; Letón, Rocío et al. (2010): Tumoral and tissue-specific expression of the major human beta-tubulin isoforms. In: *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)* 67 (4), S. 214–223. DOI: 10.1002/cm.20436.
- Lee, M. K.; Tuttle, J. B.; Rebhun, L. I.; Cleveland, D. W.; Frankfurter, A. (1990): The expression and posttranslational modification of a neuron-specific beta-tubulin isoform during chick embryogenesis. In: *Cell motility and the cytoskeleton* 17 (2), S. 118–132. DOI: 10.1002/cm.970170207.
- Lee, P. W.; Hung, B. K.; Woo, E. K.; Tai, P. T.; Choi, D. T. (1989): Effects of radiation therapy on neuropsychological functioning in patients with nasopharyngeal carcinoma. In: *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 52 (4), S. 488–492. DOI: 10.1136/jnnp.52.4.488.
- Lee, Youngjin; Morrison, Brett M.; Li, Yun; Lengacher, Sylvain; Farah, Mohamed H.; Hoffman, Paul N. et al. (2012): Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. In: *Nature* 487 (7408), S. 443–448. DOI: 10.1038/nature11314.
- Legendre, P.; Westbrook, G. L. (1991): Ifenprodil blocks N-methyl-D-aspartate receptors by a two-component mechanism. In: *Molecular pharmacology* 40 (2), S. 289–298.
- Lendahl, Urban; Zimmerman, Lyle B.; McKay, Ronald D.G. (1990): CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. In: *Cell* 60 (4), S. 585–595. DOI: 10.1016/0092-8674(90)90662-X.
- Léveillé, F.; El Gaamouch, F.; Gouix, E.; Lecocq, M.; Lobner, D.; Nicole, O.; Buisson, A. (2008): Neuronal viability is controlled by a functional relation between synaptic and extrasynaptic NMDA receptors. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22 (12), S. 4258–4271. DOI: 10.1096/fj.08-107268.
- Li, Ge; Cherrier, Monique M.; Tsuang, Debby W.; Petrie, Eric C.; Colasurdo, Elizabeth A.; Craft, Suzanne et al. (2006): Salivary cortisol and memory function in human aging. In: *Neurobiology of aging* 27 (11), S. 1705–1714. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2005.09.031.
- Li, Guangnan; Fang, Li; Fernández, Gloria; Pleasure, Samuel J. (2013): The ventral hippocampus is the embryonic origin for adult neural stem cells in the dentate gyrus. In: *Neuron* 78 (4), S. 658–672. DOI: 10.1016/j.neuron.2013.03.019.
- Li, Xuan; Heyer, Wolf-Dietrich (2009): RAD54 controls access to the invading 3'-OH end after RAD51-mediated DNA strand invasion in homologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Nucleic acids research* 37 (2), S. 638–646. DOI: 10.1093/nar/gkn980.
- Liang, Shu-Ling; Carlson, Gregory C.; Coulter, Douglas A. (2006): Dynamic regulation of synaptic GABA release by the glutamate-glutamine cycle in hippocampal area CA1. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26 (33), S. 8537–8548. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0329-06.2006.
- Lieber, Michael R. (2008): The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. In: *The Journal of biological chemistry* 283 (1), S. 1–5. DOI: 10.1074/jbc.R700039200.
- Lieber, Michael R. (2010): The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. In: *Annual review of biochemistry* 79, S. 181–211. DOI: 10.1146/annurev.biochem.052308.093131.
- Lin, Yingxi; Bloodgood, Brenda L.; Hauser, Jessica L.; Lapan, Ariya D.; Koon, Alex C.; Kim, Tae-Kyung et al. (2008): Activity-dependent regulation of inhibitory synapse development by Npas4. In: *Nature* 455 (7217), S. 1198–1204. DOI: 10.1038/nature07319.
- Liu, Chong; Sage, Jonathan C.; Miller, Michael R.; Verhaak, Roel G. W.; Hippenmeyer, Simon; Vogel, Hannes et al. (2011): Mosaic analysis with double markers reveals tumor cell of origin in glioma. In: *Cell* 146 (2), S. 209–221. DOI: 10.1016/j.cell.2011.06.014.
- Liu, Wei; Ge, Tongtong; Leng, Yashu; Pan, Zhenxiang; Fan, Jie; Yang, Wei; Cui, Ranji (2017): The Role of Neural Plasticity in Depression: From Hippocampus to Prefrontal Cortex. In: *Neural plasticity* 2017, S. 6871089. DOI: 10.1155/2017/6871089.
- Liu, Zhi-Gang; Jiang, Guanmin; Tang, Jiao; Wang, Hui; Feng, Guokai; Chen, Furong et al. (2016): c-Fos over-expression promotes radioresistance and predicts poor prognosis in malignant glioma. In: *Oncotarget* 7 (40), S. 65946–65956. DOI: 10.18632/oncotarget.11779.
- Liu, Zijong; Hu, Xuemei; Cai, Jun; Liu, Ben; Peng, Xiaozhong; Wegner, Michael; Qiu, Mengsheng (2007): Induction of oligodendrocyte differentiation by Olig2 and Sox10: evidence for reciprocal interactions and dosage-dependent mechanisms. In: *Developmental biology* 302 (2), S. 683–693. DOI: 10.1016/j.ydbio.2006.10.007.

- Lopez de Armentia, Mikel; Sah, Pankaj (2003): Development and Subunit Composition of Synaptic NMDA Receptors in the Amygdala: NR2B Synapses in the Adult Central Amygdala. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23 (17), S. 6876–6883. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.23-17-06876.2003.
- López-Bayghen, Esther; Ortega, Arturo (2011): Glial glutamate transporters: new actors in brain signaling. In: *IUBMB life* 63 (10), S. 816–823. DOI: 10.1002/iub.536.
- Loree, Jonathan; Koturbash, Igor; Kutanzi, Kristy; Baker, Mike; Pogribny, Igor; Kovalchuk, Olga (2006): Radiation-induced molecular changes in rat mammary tissue: possible implications for radiation-induced carcinogenesis. In: *International journal of radiation biology* 82 (11), S. 805–815. DOI: 10.1080/09553000600960027.
- LoTurco, J. J.; Blanton, M. G.; Kriegstein, A. R. (1991): Initial expression and endogenous activation of NMDA channels in early neocortical development. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 11 (3), S. 792–799.
- LoTurco, Joseph J.; Owens, David F.; Heath, Mark J.S.; Davis, Marion B.E.; Kriegstein, Arnold R. (1995): GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis. In: *Neuron* 15 (6), S. 1287–1298. DOI: 10.1016/0896-6273(95)90008-x.
- Love, S. (2001): Damage to nuclear DNA in Lewy body disease. In: *Neuroreport* 12 (12), S. 2725–2729. DOI: 10.1097/00001756-200108280-00027.
- Lu, Ziwen; Yang, Tao; Wang, Lei; Qiu, Qi; Zhao, Yizhou; Wu, Aiming et al. (2020): Comparison of different protocols of Morris water maze in cognitive impairment with heart failure. In: *Brain and behavior* 10 (2), e01519. DOI: 10.1002/brb3.1519.
- Lunsford, L. D.; Kondziolka, D. (2001): Adverse long-term effects of brain radiotherapy in adult low-grade glioma patients. In: *Neurology* 57 (11), S. 2150–2151. DOI: 10.1212/wnl.57.11.2150-a.
- Ma, Yunmei; Schwarz, Klaus; Lieber, Michael R. (2005): The Artemis:DNA-PKcs endonuclease cleaves DNA loops, flaps, and gaps. In: *DNA repair* 4 (7), S. 845–851. DOI: 10.1016/j.dnarep.2005.04.013.
- Madabhushi, Ram; Gao, Fan; Pfenning, Andreas R.; Pan, Ling; Yamakawa, Satoko; Seo, Jinsoo et al. (2015): Activity-Induced DNA Breaks Govern the Expression of Neuronal Early-Response Genes. In: *Cell* 161 (7), S. 1592–1605. DOI: 10.1016/j.cell.2015.05.032.
- Madabhushi, Ram; Kim, Tae-Kyung (2018): Emerging themes in neuronal activity-dependent gene expression. In: *Molecular and cellular neurosciences* 87, S. 27–34. DOI: 10.1016/j.mcn.2017.11.009.
- Maddox, Stephanie A.; Monsey, Melissa S.; Schafer, Glenn E. (2011): Early growth response gene 1 (Egr-1) is required for new and reactivated fear memories in the lateral amygdala. In: *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)* 18 (1), S. 24–38. DOI: 10.1101/lm.1980211.
- Madsen, T.M.; Kristjansen, P.E.G.; Bolwig, T.G.; Wörtwein, G. (2003): Arrested neuronal proliferation and impaired hippocampal function following fractionated brain irradiation in the adult rat. In: *Neuroscience* 119 (3), S. 635–642. DOI: 10.1016/S0306-4522(03)00199-4.
- Magistretti, Pierre J.; Allaman, Igor (2015): A cellular perspective on brain energy metabolism and functional imaging. In: *Neuron* 86 (4), S. 883–901. DOI: 10.1016/j.neuron.2015.03.035.
- Maire, Cécile L.; Wegener, Amélie; Kerninon, Christophe; Nait Oumesmar, Brahim (2010): Gain-of-function of Olig transcription factors enhances oligodendrogenesis and myelination. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 28 (9), S. 1611–1622. DOI: 10.1002/stem.480.
- Mandraj, Rajakumar; Chekuri, Anil; Bhaskar, C.; Duning, Kerstin; Kremerskothen, Joachim; Kondapi, Anand K. (2011): Topoisomerase II β associates with Ku70 and PARP-1 during double strand break repair of DNA in neurons. In: *Archives of biochemistry and biophysics* 516 (2), S. 128–137. DOI: 10.1016/j.abb.2011.10.001.
- Mao, Zhiyong; Bozzella, Michael; Seluanov, Andrei; Gorbunova, Vera (2008): Comparison of nonhomologous end joining and homologous recombination in human cells. In: *DNA repair* 7 (10), S. 1765–1771. DOI: 10.1016/j.dnarep.2008.06.018.
- Mardones, Muriel D.; Jorquera, Patricia V.; Herrera-Soto, Andrea; Ampuero, Estibaliz; Bustos, Fernando J.; van Zundert, Brigitte; Varela-Nallar, Lorena (2019): PSD95 regulates morphological development of adult-born granule neurons in the mouse hippocampus. In: *Journal of chemical neuroanatomy* 98, S. 117–123. DOI: 10.1016/j.jchemneu.2019.04.009.
- Maric, Dragan; Liu, Qi-Ying; Grant, Geraldine M.; Andreadis, Joanne D.; Hu, Qian; Chang, Yoong Hee et al. (2000): Functional ionotropic glutamate receptors emerge during terminal cell division and early neuronal differentiation of rat neuroepithelial cells. In: *J. Neurosci. Res.* 61 (6), S. 652–662. DOI: 10.1002/1097-4547(20000915)61:6<652::AID-JNR9>3.0.CO;2-J.
- Marín, Oscar; Valiente, Manuel; Ge, Xuecai; Tsai, Li-Huei (2010): Guiding neuronal cell migrations. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2 (2), a001834. DOI: 10.1101/cshperspect.a001834.
- Markesbery, William R.; Lovell, Mark A. (2006): DNA oxidation in Alzheimer's disease. In: *Antioxidants & redox signaling* 8 (11-12), S. 2039–2045. DOI: 10.1089/ars.2006.8.2039.
- Mattson, Mark P. (2008): Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1144, S. 97–112. DOI: 10.1196/annals.1418.005.
- Matulova, Petra; Marini, Victoria; Burgess, Rebecca C.; Sisakova, Alexandra; Kwon, Youngho; Rothstein, Rodney et al. (2009): Cooperativity of Mus81.Mms4 with Rad54 in the resolution of recombination and replication intermediates. In: *The Journal of biological chemistry* 284 (12), S. 7733–7745. DOI: 10.1074/jbc.M806192200.
- Mazin, Alexander V.; Alexeev, Andrei A.; Kowalczykowski, Stephen C. (2003): A novel function of Rad54 protein. Stabilization of the Rad51 nucleoprotein filament. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (16), S. 14029–14036. DOI: 10.1074/jbc.M212779200.

- Mazina, Olga M.; Mazin, Alexander V. (2004): Human Rad54 protein stimulates DNA strand exchange activity of hRad51 protein in the presence of Ca²⁺. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (50), S. 52042–52051. DOI: 10.1074/jbc.M410244200.
- Mazina, Olga M.; Mazin, Alexander V. (2008): Human Rad54 protein stimulates human Mus81-Eme1 endonuclease. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (47), S. 18249–18254. DOI: 10.1073/pnas.0807016105.
- Mc Laughlin, J. P. (2015): Some characteristics and effects of natural radiation. In: *Radiation protection dosimetry* 167 (1-3), S. 2–7. DOI: 10.1093/rpd/ncv206.
- McDonald, Robert J.; White, Norman M. (1994): Parallel information processing in the water maze: Evidence for independent memory systems involving dorsal striatum and hippocampus. In: *Behavioral and Neural Biology* 61 (3), S. 260–270. DOI: 10.1016/S0163-1047(05)80009-3.
- McIlwain, David R.; Berger, Thorsten; Mak, Tak W. (2013): Caspase functions in cell death and disease. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5 (4), a008656. DOI: 10.1101/cshperspect.a008656.
- McKinnon, Peter J. (2013): Maintaining genome stability in the nervous system. In: *Nature neuroscience* 16 (11), S. 1523–1529. DOI: 10.1038/nn.3537.
- Mehta, Anuja; Haber, James E. (2014): Sources of DNA double-strand breaks and models of recombinational DNA repair. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 6 (9), a016428. DOI: 10.1101/cshperspect.a016428.
- Meister, A.; Anderson, M. E. (1983): Glutathione. In: *Annual review of biochemistry* 52, S. 711–760. DOI: 10.1146/annurev.bi.52.070183.003431.
- Mennerick, S.; Zorumski, C. F. (2000): Neural activity and survival in the developing nervous system. In: *Molecular neurobiology* 22 (1-3), S. 41–54. DOI: 10.1385/MN:22:1-3:041.
- Merlo, Daniela; Molinari, Cristiana; Racaniello, Mauro; Garaci, Enrico; Cardinale, Alessio (2016): DNA Double Strand Breaks: A Common Theme in Neurodegenerative Diseases. In: *Current Alzheimer research* 13 (11), S. 1208–1218. DOI: 10.2174/1567205013666160401114915.
- Messaoudi, Elhoucine; Kanhema, Tambudzai; Soulé, Jonathan; Tiron, Adrian; Dagyte, Girstaute; da Silva, Bruno; Bramham, Clive R. (2007): Sustained Arc/Arg3.1 synthesis controls long-term potentiation consolidation through regulation of local actin polymerization in the dentate gyrus in vivo. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27 (39), S. 10445–10455. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2883-07.2007.
- Messiaen, S.; Le Bras, A.; Duquenne, C.; Barroca, V.; Moison, D.; Déchamps, N. et al. (2013): Rad54 is required for the normal development of male and female germ cells and contributes to the maintenance of their genome integrity after genotoxic stress. In: *Cell death & disease* 4, e774. DOI: 10.1038/cddis.2013.281.
- Miller, R. W. (1969): Delayed radiation effects in atomic-bomb survivors. Major observations by the Atomic Bomb Casualty Commission are evaluated. In: *Science (New York, N.Y.)* 166 (3905), S. 569–574. DOI: 10.1126/science.166.3905.569.
- Mills, Kevin D.; Ferguson, David O.; Essers, Jeroen; Eckersdorff, Mark; Kanaar, Roland; Alt, Frederick W. (2004): Rad54 and DNA Ligase IV cooperate to maintain mammalian chromatid stability. In: *Genes & development* 18 (11), S. 1283–1292. DOI: 10.1101/gad.1204304.
- Ming, Guo-li; Song, Hongjun (2011): Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. In: *Neuron* 70 (4), S. 687–702. DOI: 10.1016/j.neuron.2011.05.001.
- Mink, J. W.; Blumenschine, R. J.; Adams, D. B. (1981): Ratio of central nervous system to body metabolism in vertebrates: its constancy and functional basis. In: *The American journal of physiology* 241 (3), R203–12. DOI: 10.1152/ajpregu.1981.241.3.R203.
- Mizumatsu, Shinichiro; Monje, Michelle L.; Morhardt, Duncan R.; Rola, Radoslaw; Palmer, Theo D.; Fike, John R. (2003): Extreme sensitivity of adult neurogenesis to low doses of X-irradiation. In: *Cancer research* 63 (14), S. 4021–4027.
- Modesti, M.; Hesse, J. E.; Gellert, M. (1999): DNA binding of Xrcc4 protein is associated with V(D)J recombination but not with stimulation of DNA ligase IV activity. In: *The EMBO journal* 18 (7), S. 2008–2018. DOI: 10.1093/emboj/18.7.2008.
- Mongiat, Lucas A.; Espósito, M. Soledad; Lombardi, Gabriela; Schinder, Alejandro F. (2009): Reliable activation of immature neurons in the adult hippocampus. In: *PloS one* 4 (4), e5320. DOI: 10.1371/journal.pone.0005320.
- Monje, Michelle L.; Toda, Hiroki; Palmer, Theo D. (2003): Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. In: *Science (New York, N.Y.)* 302 (5651), S. 1760–1765. DOI: 10.1126/science.1088417.
- Monyer, H.; Sprengel, R.; Schoepfer, R.; Herb, A.; Higuchi, M.; Lomeli, H. et al. (1992): Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. In: *Science (New York, N.Y.)* 256 (5060), S. 1217–1221. DOI: 10.1126/science.256.5060.1217.
- Monyer, Hannah; Burnashev, Nail; Laurie, David J.; Sakmann, Bert; Seeburg, Peter H. (1994): Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. In: *Neuron* 12 (3), S. 529–540. DOI: 10.1016/0896-6273(94)90210-0.
- Morgan, J. I.; Cohen, D. R.; Hempstead, J. L.; Curran, T. (1987): Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. In: *Science (New York, N.Y.)* 237 (4811), S. 192–197. DOI: 10.1126/science.3037702.
- Morris, R. G.; Garrud, P.; Rawlins, J. N.; O'Keefe, J. (1982): Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. In: *Nature* 297 (5868), S. 681–683. DOI: 10.1038/297681a0.
- Morris, R. G.; Hagan, J. J.; Rawlins, J. N. (1986): Allocentric spatial learning by hippocampectomised rats: a further test of the "spatial mapping" and "working memory" theories of hippocampal function. In: *The Quarterly journal of experimental psychology. B, Comparative and physiological psychology* 38 (4), S. 365–395.

-
- Morris, R. G. M.; Schenk, F.; Tweedie, F.; Jarrard, L. E. (1990): Ibotenate Lesions of Hippocampus and/or Subiculum: Dissociating Components of Allocentric Spatial Learning. In: *The European journal of neuroscience* 2 (12), S. 1016–1028. DOI: 10.1111/j.1460-9568.1990.tb00014.x.
- Morris, Richard G.M. (1981): Spatial localization does not require the presence of local cues. In: *Learning and Motivation* 12 (2), S. 239–260. DOI: 10.1016/0023-9690(81)90020-5.
- Moser, E. I.; Krobort, K. A.; Moser, M. B.; Morris, R. G. (1998): Impaired spatial learning after saturation of long-term potentiation. In: *Science (New York, N.Y.)* 281 (5385), S. 2038–2042. DOI: 10.1126/science.281.5385.2038.
- Moser, Edvard I.; Roudi, Yasser; Witter, Menno P.; Kentros, Clifford; Bonhoeffer, Tobias; Moser, May-Britt (2014): Grid cells and cortical representation. In: *Nature reviews. Neuroscience* 15 (7), S. 466–481. DOI: 10.1038/nrn3766.
- Moser, May-Britt; Rowland, David C.; Moser, Edvard I. (2015): Place Cells, Grid Cells, and Memory. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 7 (2), a021808. DOI: 10.1101/cshperspect.a021808.
- Nácher, J.; Varea, E.; Miguel Blasco-Ibáñez, J.; Gómez-Climent, M. A.; Castillo-Gómez, E.; Crespo, C. et al. (2007): N-methyl-d-aspartate receptor expression during adult neurogenesis in the rat dentate gyrus. In: *Neuroscience* 144 (3), S. 855–864. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2006.10.021.
- Nagahara, Alan H.; Merrill, David A.; Coppola, Giovanni; Tsukada, Shingo; Schroeder, Brock E.; Shaked, Gideon M. et al. (2009): Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primate models of Alzheimer's disease. In: *Nature medicine* 15 (3), S. 331–337. DOI: 10.1038/nm.1912.
- Nagai, Rie; Tsunoda, Shigeru; Hori, Yasuharu; Asada, Hiroshi (2000a): Selective vulnerability to radiation in the hippocampal dentate granule cells. In: *Surgical Neurology* 53 (5), S. 503–507. DOI: 10.1016/S0090-3019(00)00214-7.
- Nagai, Rie; Tsunoda, Shigeru; Hori, Yasuharu; Asada, Hiroshi (2000b): Selective vulnerability to radiation in the hippocampal dentate granule cells. In: *Surgical Neurology* 53 (5), S. 503–507. DOI: 10.1016/S0090-3019(00)00214-7.
- Nakanishi, S. (1992): Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. In: *Science (New York, N.Y.)* 258 (5082), S. 597–603. DOI: 10.1126/science.1329206.
- Nave, Klaus-Armin (2010): Myelination and the trophic support of long axons. In: *Nature reviews. Neuroscience* 11 (4), S. 275–283. DOI: 10.1038/nrn2797.
- Nicholson, D. W.; Ali, A.; Thornberry, N. A.; Vaillancourt, J. P.; Ding, C. K.; Gallant, M. et al. (1995): Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. In: *Nature* 376 (6535), S. 37–43. DOI: 10.1038/376037a0.
- Nicoll, Roger A.; Schmitz, Dietmar (2005): Synaptic plasticity at hippocampal mossy fibre synapses. In: *Nature reviews. Neuroscience* 6 (11), S. 863–876. DOI: 10.1038/nrn1786.
- Nissenkorn, Andreea; Ben-Zeev, Bruria (2015): Ataxia telangiectasia. In: *Handbook of clinical neurology* 132, S. 199–214. DOI: 10.1016/B978-0-444-62702-5.00014-7.
- Notaras, Michael; van den Buuse, Maarten (2019): Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF): Novel Insights into Regulation and Genetic Variation. In: *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 25 (5), S. 434–454. DOI: 10.1177/1073858418810142.
- Nospikel, T. (2007): DNA repair in differentiated cells: some new answers to old questions. In: *Neuroscience* 145 (4), S. 1213–1221. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2006.07.006.
- Odawara, A.; Saitoh, Y.; Alhebshi, A. H.; Gotoh, M.; Suzuki, I. (2014): Long-term electrophysiological activity and pharmacological response of a human induced pluripotent stem cell-derived neuron and astrocyte co-culture. In: *Biochemical and biophysical research communications* 443 (4), S. 1176–1181. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.12.142.
- O'Driscoll, M.; Cerosaletti, K. M.; Girard, P. M.; Dai, Y.; Stumm, M.; Kysela, B. et al. (2001): DNA ligase IV mutations identified in patients exhibiting developmental delay and immunodeficiency. In: *Molecular cell* 8 (6), S. 1175–1185. DOI: 10.1016/S1097-2765(01)00408-7.
- O'Keefe, J. (1976): Place units in the hippocampus of the freely moving rat. In: *Experimental neurology* 51 (1), S. 78–109. DOI: 10.1016/0014-4886(76)90055-8.
- O'Keefe, J.; Dostrovsky, J. (1971): The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. In: *Brain Research* 34 (1), S. 171–175. DOI: 10.1016/0006-8993(71)90358-1.
- O'Keefe, John; Nadel, Lynn (1978): The hippocampus as a cognitive map.
- Olney, J. W. (1982): The toxic effects of glutamate and related compounds in the retina and the brain. In: *Retina (Philadelphia, Pa.)* 2 (4), S. 341–359.
- Onodera, Hiroshi; Kogure, Kyuya; Ono, Yoshitaka; Igarashi, Koichi; Kiyota, Yoshihiro; Nagaoka, Akinobu (1989): Proto-oncogene c-fos is transiently induced in the rat cerebral cortex after forebrain ischemia. In: *Neuroscience letters* 98 (1), S. 101–104. DOI: 10.1016/0304-3940(89)90381-9.
- Orii, Kenji E.; Lee, Youngsoo; Kondo, Naomi; McKinnon, Peter J. (2006): Selective utilization of nonhomologous end-joining and homologous recombination DNA repair pathways during nervous system development. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (26), S. 10017–10022. DOI: 10.1073/pnas.0602436103.
-

-
- O'Shea, R. D. (2002): Roles and regulation of glutamate transporters in the central nervous system. In: *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 29 (11), S. 1018–1023. DOI: 10.1046/j.1440-1681.2002.03770.x.
- Otake, M.; Schull, W. J. (1984): In utero exposure to A-bomb radiation and mental retardation; a reassessment. In: *The British journal of radiology* 57 (677), S. 409–414. DOI: 10.1259/0007-1285-57-677-409.
- Otake, M.; Schull, W. J. (1998): Radiation-related brain damage and growth retardation among the prenatally exposed atomic bomb survivors. In: *International journal of radiation biology* 74 (2), S. 159–171. DOI: 10.1080/095530098141555.
- Overstreet Wadiche, Linda; Bromberg, Daniel A.; Bensen, Aesoon L.; Westbrook, Gary L. (2005): GABAergic signaling to newborn neurons in dentate gyrus. In: *Journal of neurophysiology* 94 (6), S. 4528–4532. DOI: 10.1152/jn.00633.2005.
- Overstreet-Wadiche, Linda S.; Bensen, Aesoon L.; Westbrook, Gary L. (2006): Delayed development of adult-generated granule cells in dentate gyrus. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26 (8), S. 2326–2334. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4111-05.2006.
- Owen, Michael J.; Sawa, Akira; Mortensen, Preben B. (2016): Schizophrenia. In: *The Lancet* 388 (10039), S. 86–97. DOI: 10.1016/S0140-6736(15)01121-6.
- Palygin, Oleg; Lalo, Ulyana; Pankratov, Yuriy (2011): Distinct pharmacological and functional properties of NMDA receptors in mouse cortical astrocytes. In: *British journal of pharmacology* 163 (8), S. 1755–1766. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2011.01374.x.
- Palygin, Oleg; Lalo, Ulyana; Verkhratsky, Alexei; Pankratov, Yuriy (2010): Ionotropic NMDA and P2X1/5 receptors mediate synaptically induced Ca²⁺ signalling in cortical astrocytes. In: *Cell calcium* 48 (4), S. 225–231. DOI: 10.1016/j.ceca.2010.09.004.
- Panier, Stephanie; Boulton, Simon J. (2014): Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 15 (1), S. 7–18. DOI: 10.1038/nrm3719.
- Pedraza, Liliana; Fidler, Lazar; Staugaitis, Susan M.; Colman, David R. (1997): The Active Transport of Myelin Basic Protein into the Nucleus Suggests a Regulatory Role in Myelination. In: *Neuron* 18 (4), S. 579–589. DOI: 10.1016/S0896-6273(00)80299-8.
- Peissner, W.; Kocher, M.; Treuer, H.; Gillardon, F. (1999): Ionizing radiation-induced apoptosis of proliferating stem cells in the dentate gyrus of the adult rat hippocampus. In: *Brain research. Molecular brain research* 71 (1), S. 61–68. DOI: 10.1016/S0169-328X(99)00170-9.
- Penner, Marsha R.; Mizumori, Sheri J. Y. (2012): Neural systems analysis of decision making during goal-directed navigation. In: *Progress in Neurobiology* 96 (1), S. 96–135. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2011.08.010.
- Pérez-Cadahía, Beatriz; Drobic, Bojan; Davie, James R. (2011): Activation and function of immediate-early genes in the nervous system. In: *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 89 (1), S. 61–73. DOI: 10.1139/O10-138.
- Petralia, Ronald S.; Wang, Ya-Xian; Hua, Fang; Yi, Zhaohong; Zhou, Arthur; Ge, Linna et al. (2010): Organization of NMDA receptors at extrasynaptic locations. In: *Neuroscience* 167 (1), S. 68–87. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2010.01.022.
- Petukhova, G.; Stratton, S.; Sung, P. (1998): Catalysis of homologous DNA pairing by yeast Rad51 and Rad54 proteins. In: *Nature* 393 (6680), S. 91–94. DOI: 10.1038/30037.
- Pfeiffer, P.; Goedecke, W.; Kuhfittig-Kulle, S.; Obe, G. (2004): Pathways of DNA double-strand break repair and their impact on the prevention and formation of chromosomal aberrations. In: *Cytogenetic and genome research* 104 (1-4), S. 7–13. DOI: 10.1159/000077460.
- Phatnani, Hemali; Maniatis, Tom (2015): Astrocytes in neurodegenerative disease. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 7 (6). DOI: 10.1101/cshperspect.a020628.
- Piatti, Verónica C.; Espósito, M. Soledad; Schinder, Alejandro F. (2006): The timing of neuronal development in adult hippocampal neurogenesis. In: *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 12 (6), S. 463–468. DOI: 10.1177/1073858406293538.
- Platel, Jean-Claude; Kelsch, Wolfgang (2013): Role of NMDA receptors in adult neurogenesis: an ontogenetic (re)view on activity-dependent development. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 70 (19), S. 3591–3601. DOI: 10.1007/s00018-013-1262-z.
- Plath, Niels; Ohana, Ora; Dammermann, Björn; Errington, Mick L.; Schmitz, Dietmar; Gross, Christina et al. (2006): Arc/Arg3.1 is essential for the consolidation of synaptic plasticity and memories. In: *Neuron* 52 (3), S. 437–444. DOI: 10.1016/j.neuron.2006.08.024.
- Porter, J. T.; McCarthy, K. D. (1995): GFAP-positive hippocampal astrocytes in situ respond to glutamatergic neuroleptans with increases in Ca²⁺i. In: *Glia* 13 (2), S. 101–112. DOI: 10.1002/glia.440130204.
- Posner, J. B. (1992): Management of brain metastases. In: *Revue neurologique* 148 (6-7), S. 477–487.
- Prakash, Rohit; Zhang, Yu; Feng, Weiran; Jasin, Maria (2015): Homologous recombination and human health: the roles of BRCA1, BRCA2, and associated proteins. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 7 (4), a016600. DOI: 10.1101/cshperspect.a016600.
- Preibisch, Stephan; Saalfeld, Stephan; Tomancak, Pavel (2009): Globally optimal stitching of tiled 3D microscopic image acquisitions. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 25 (11), S. 1463–1465. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp184.
- Preston, D. L.; Kusumi, S.; Tomonaga, M.; Izumi, S.; Ron, E.; Kuramoto, A. et al. (1994): Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part III. Leukemia, lymphoma and multiple myeloma, 1950-1987. In: *Radiation research* 137 (2 Suppl), S68-97.
- Preston, D. L.; Ron, E.; Tokuoka, S.; Funamoto, S.; Nishi, N.; Soda, M. et al. (2007): Solid cancer incidence in atomic bomb survivors: 1958-1998. In: *Radiation research* 168 (1), S. 1–64. DOI: 10.1667/RR0763.1.
-

- Price, D. L.; Struble, R. G.; Whitehouse, P. J.; Kitt, C. A.; Cork, L. C.; Walker, L. C.; Casanova, M. F. (1986): Alzheimer's disease: a multisystem disorder. In: *Research publications - Association for Research in Nervous and Mental Disease* 64, S. 209–214.
- Pruitt, Amy A. (2017): Epidemiology, Treatment, and Complications of Central Nervous System Metastases. In: *Continuum (Minneapolis, Minn.)* 23 (6, Neuro-oncology), S. 1580–1600. DOI: 10.1212/CON.0000000000000551.
- Raber, Jacob; Rola, Radoslaw; LeFevour, Anthony; Morhardt, Duncan; Curley, Justine; Mizumatsu, Shinichiro et al. (2004): Radiation-induced cognitive impairments are associated with changes in indicators of hippocampal neurogenesis. In: *Radiation research* 162 (1), S. 39–47. DOI: 10.1667/RR3206.
- Rakic, Pasko; Caviness, Verne S. (1995): Cortical development: View from neurological mutants two decades later. In: *Neuron* 14 (6), S. 1101–1104. DOI: 10.1016/0896-6273(95)90258-9.
- Ramirez-Amaya, Victor; Marrone, Diano F.; Gage, Fred H.; Worley, Paul F.; Barnes, Carol A. (2006): Integration of new neurons into functional neural networks. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26 (47), S. 12237–12241. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2195-06.2006.
- Ranjha, Lepakshi; Howard, Sean M.; Cejka, Petr (2018): Main steps in DNA double-strand break repair: an introduction to homologous recombination and related processes. In: *Chromosoma* 127 (2), S. 187–214. DOI: 10.1007/s00412-017-0658-1.
- Raschle, Markus; van Komen, Stephen; Chi, Peter; Ellenberger, Tom; Sung, Patrick (2004): Multiple interactions with the Rad51 recombinase govern the homologous recombination function of Rad54. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (50), S. 51973–51980. DOI: 10.1074/jbc.M410101200.
- Rass, Ulrich; Ahel, Ivan; West, Stephen C. (2007): Defective DNA repair and neurodegenerative disease. In: *Cell* 130 (6), S. 991–1004. DOI: 10.1016/j.cell.2007.08.043.
- Rauner, Claudia; Köhr, Georg (2010): Triheteromeric NR1/NR2A/NR2B Receptors Constitute the Major N-Methyl-D-aspartate Receptor Population in Adult Hippocampal Synapses. In: *The Journal of biological chemistry* 286 (9), S. 7558–7566. DOI: 10.1074/jbc.M110.182600.
- Reichardt, Louis F. (2006): Neurotrophin-regulated signalling pathways. In: *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 361 (1473), S. 1545–1564. DOI: 10.1098/rstb.2006.1894.
- Reynolds, I. J.; Miller, R. J. (1989): Ifenprodil is a novel type of N-methyl-D-aspartate receptor antagonist: interaction with polyamines. In: *Molecular pharmacology* 36 (5), S. 758–765.
- Riballo, Enriqueta; Kuhne, Martin; Rief, Nicole; Doherty, Aidan; Smith, Graeme C. M.; Recio, Maria-Jose et al. (2004): A pathway of double-strand break rejoining dependent upon ATM, Artemis, and proteins locating to gamma-H2AX foci. In: *Molecular cell* 16 (5), S. 715–724. DOI: 10.1016/j.molcel.2004.10.029.
- Riballo, Enriqueta; Woodbine, Lisa; Stiff, Thomas; Walker, Sarah A.; Goodarzi, Aaron A.; Jeggo, Penny A. (2009): XLF-Cernunnos promotes DNA ligase IV-XRCC4 re-adenylation following ligation. In: *Nucleic acids research* 37 (2), S. 482–492. DOI: 10.1093/nar/gkn957.
- Ridnour, Lisa A.; Thomas, Douglas D.; Mancardi, Daniele; Espey, Michael G.; Miranda, Katrina M.; Paolocci, Nazareno et al. (2004): The chemistry of nitrosative stress induced by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species. Putting perspective on stressful biological situations. In: *Biological chemistry* 385 (1), S. 1–10. DOI: 10.1515/BC.2004.001.
- Rogakou, E. P.; Boon, C.; Redon, C.; Bonner, W. M. (1999): Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. In: *The Journal of cell biology* 146 (5), S. 905–916. DOI: 10.1083/jcb.146.5.905.
- Rogakou, E. P.; Pilch, D. R.; Orr, A. H.; Ivanova, V. S.; Bonner, W. M. (1998): DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. In: *The Journal of biological chemistry* 273 (10), S. 5858–5868. DOI: 10.1074/jbc.273.10.5858.
- Rola, Radoslaw; Raber, Jacob; Rizk, Angela; Otsuka, Shinji; VandenBerg, Scott R.; Morhardt, Duncan R.; Fike, John R. (2004): Radiation-induced impairment of hippocampal neurogenesis is associated with cognitive deficits in young mice. In: *Experimental neurology* 188 (2), S. 316–330. DOI: 10.1016/j.expneurol.2004.05.005.
- Rola, Radoslaw; Zou, Yani; Huang, Ting-Ting; Fishman, Kelly; Baure, Jennifer; Rosi, Susanna et al. (2007): Lack of extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) in the microenvironment impacts radiation-induced changes in neurogenesis. In: *Free radical biology & medicine* 42 (8), 1133–45; discussion 1131–2. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.01.020.
- Roman, Deborah D.; Sperduto, Paul W. (1995): Neuropsychological effects of cranial radiation: current knowledge and future directions. In: *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics* 31 (4), S. 983–998. DOI: 10.1016/0360-3016(94)00550-8.
- Ron, E.; Modan, B.; Floro, S.; Harkedar, I.; Gurewitz, R. (1982): Mental function following scalp irradiation during childhood. In: *American journal of epidemiology* 116 (1), S. 149–160. DOI: 10.1093/oxfordjournals.aje.a113389.
- Roque, Telma; Haton, Céline; Etienne, Olivier; Chicheportiche, Alexandra; Rousseau, Laure; Martin, Ludovic et al. (2012): Lack of a p21waf1/cip-dependent G1/S checkpoint in neural stem and progenitor cells after DNA damage in vivo. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 30 (3), S. 537–547. DOI: 10.1002/stem.1010.
- Rosi, Susanna; Andres-Mach, Marta; Fishman, Kelly M.; Levy, William; Ferguson, Ryan A.; Fike, John R. (2008): Cranial irradiation alters the behaviorally induced immediate-early gene arc (activity-regulated cytoskeleton-associated protein). In: *Cancer research* 68 (23), S. 9763–9770. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1861.
- Rossi, Matthew J.; Mazin, Alexander V. (2008): Rad51 protein stimulates the branch migration activity of Rad54 protein. In: *The Journal of biological chemistry* 283 (36), S. 24698–24706. DOI: 10.1074/jbc.M800839200.

- Roth, David B. (2014): V(D)J Recombination: Mechanism, Errors, and Fidelity. In: *Microbiology spectrum* 2 (6). DOI: 10.1128/microbiolspec.MDNA3-0041-2014.
- Rothkamm, Kai; Kruger, Ines; Thompson, Larry H.; Lobrich, Markus (2003a): Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. In: *Molecular and cellular biology* 23 (16), S. 5706–5715. DOI: 10.1128/mcb.23.16.5706-5715.2003.
- Rothkamm, Kai; Krüger, Ines; Thompson, Larry H.; Löbrich, Markus (2003b): Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. In: *Molecular and cellular biology* 23 (16), S. 5706–5715. DOI: 10.1128/MCB.23.16.5706-5715.2003.
- Rothman, S. (1984): Synaptic release of excitatory amino acid neurotransmitter mediates anoxic neuronal death. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 4 (7), S. 1884–1891.
- Rousseau, Laure; Etienne, Olivier; Roque, Telma; Desmaze, Chantal; Haton, Céline; Mouthon, Marc-André et al. (2012): In vivo importance of homologous recombination DNA repair for mouse neural stem and progenitor cells. In: *PLoS one* 7 (5), e37194. DOI: 10.1371/journal.pone.0037194.
- Saab, Aiman S.; Tzvetavona, Iva D.; Trevisiol, Andrea; Baltan, Selva; Dibaj, Payam; Kusch, Kathrin et al. (2016): Oligodendroglial NMDA Receptors Regulate Glucose Import and Axonal Energy Metabolism. In: *Neuron* 91 (1), S. 119–132. DOI: 10.1016/j.neuron.2016.05.016.
- Sadetzki, Siegal; Chetrit, Angela; Freedman, Laurence; Stovall, Marilyn; Modan, Baruch; Novikov, Ilya (2005): Long-term follow-up for brain tumor development after childhood exposure to ionizing radiation for tinea capitis. In: *Radiation research* 163 (4), S. 424–432. DOI: 10.1667/rr3329.
- Sak, Ali; Stuschke, Martin (2010): Use of gammaH2AX and other biomarkers of double-strand breaks during radiotherapy. In: *Seminars in radiation oncology* 20 (4), S. 223–231. DOI: 10.1016/j.semradonc.2010.05.004.
- San Filippo, Joseph; Sung, Patrick; Klein, Hannah (2008): Mechanism of eukaryotic homologous recombination. In: *Annual review of biochemistry* 77, S. 229–257. DOI: 10.1146/annurev.biochem.77.061306.125255.
- Santis, Marco de; Cesari, Elena; Nobili, E.; Straface, Gianluca; Cavaliere, Anna Franca; Caruso, Alessandro (2007): Radiation effects on development. In: *Birth defects research. Part C, Embryo today : reviews* 81 (3), S. 177–182. DOI: 10.1002/bdrc.20099.
- Sargolini, Francesca; Fyhn, Marianne; Hafting, Torkel; McNaughton, Bruce L.; Witter, Menno P.; Moser, May-Britt; Moser, Edvard I. (2006): Conjunctive representation of position, direction, and velocity in entorhinal cortex. In: *Science (New York, N.Y.)* 312 (5774), S. 758–762. DOI: 10.1126/science.1125572.
- Sasaki, R.; Matsumoto, A.; Itoh, K.; Kawabe, T.; Ota, Y.; Yamada, K. et al. (2000): Target cells of apoptosis in the adult murine dentate gyrus and O4 immunoreactivity after ionizing radiation. In: *Neuroscience letters* 279 (1), S. 57–60. DOI: 10.1016/S0304-3940(99)00910-6.
- Sattler, Rita; Xiong, Zhigang; Lu, Wei-Yang; MacDonald, John F.; Tymianski, Michael (2000): Distinct Roles of Synaptic and Extrasynaptic NMDA Receptors in Excitotoxicity. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20 (1), S. 22–33. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.20-01-00022.2000.
- Schafer, K. A. (1998): The cell cycle: a review. In: *Veterinary pathology* 35 (6), S. 461–478. DOI: 10.1177/030098589803500601.
- Schaukowitch, Katie; Joo, Jae-Yeol; Liu, Xihui; Watts, Jonathan K.; Martinez, Carlos; Kim, Tae-Kyung (2014): Enhancer RNA facilitates NELF release from immediate early genes. In: *Molecular cell* 56 (1), S. 29–42. DOI: 10.1016/j.molcel.2014.08.023.
- Schmidt-Hieber, Christoph; Jonas, Peter; Bischofberger, Josef (2004): Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. In: *Nature* 429 (6988), S. 184–187. DOI: 10.1038/nature02553.
- Schultz, L. B.; Chehab, N. H.; Malikzay, A.; Halazonetis, T. D. (2000a): p53 binding protein 1 (53BP1) is an early participant in the cellular response to DNA double-strand breaks. In: *The Journal of cell biology* 151 (7), S. 1381–1390. DOI: 10.1083/jcb.151.7.1381.
- Schultz, L. B.; Chehab, N. H.; Malikzay, A.; Halazonetis, T. D. (2000b): p53 binding protein 1 (53BP1) is an early participant in the cellular response to DNA double-strand breaks. In: *The Journal of cell biology* 151 (7), S. 1381–1390. DOI: 10.1083/jcb.151.7.1381.
- Seifert, Gerald; Steinhäuser, Christian (2001): Ionotropic glutamate receptors in astrocytes. In: *Progress in brain research* 132, S. 287–299. DOI: 10.1016/S0079-6123(01)32083-6.
- Simple, Bridgette D.; Blomgren, Klas; Gimlin, Kayleen; Ferriero, Donna M.; Noble-Haeusslein, Linda J. (2013): Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. In: *Progress in Neurobiology* 106–107, S. 1–16. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2013.04.001.
- Shanbhag, Niraj M.; Evans, Mark D.; Mao, Wenjie; Nana, Alissa L.; Seeley, William W.; Adame, Anthony et al. (2019): Early neuronal accumulation of DNA double strand breaks in Alzheimer's disease. In: *Acta neuropathologica communications* 7 (1), S. 77. DOI: 10.1186/s40478-019-0723-5.
- Sharma, Sudha (2007): Age-related nonhomologous end joining activity in rat neurons. In: *Brain research bulletin* 73 (1–3), S. 48–54. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2007.02.001.
- Shepherd, Jason D.; Rumbaugh, Gavin; Wu, Jing; Chowdhury, Shoaib; Plath, Niels; Kuhl, Dietmar et al. (2006): Arc/Arg3.1 mediates homeostatic synaptic scaling of AMPA receptors. In: *Neuron* 52 (3), S. 475–484. DOI: 10.1016/j.neuron.2006.08.034.
- Shi, Lei; Adams, Michelle M.; Long, Ashley; Carter, Christy C.; Bennett, Colleen; Sonntag, William E. et al. (2006): Spatial learning and memory deficits after whole-brain irradiation are associated with changes in NMDA receptor subunits in the hippocampus. In: *Radiation research* 166 (6), S. 892–899. DOI: 10.1667/RR0588.1.

- Shiloh, Yosef; Ziv, Yael (2013): The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 14 (4), S. 197–210. DOI: 10.1038/nrm3546.
- Shiotsuki, Hiromi; Yoshimi, Kenji; Shimo, Yasushi; Funayama, Manabu; Takamatsu, Yukio; Ikeda, Kazutaka et al. (2010): A rotarod test for evaluation of motor skill learning. In: *Journal of neuroscience methods* 189 (2), S. 180–185. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2010.03.026.
- Shors, T. J.; Miesegaes, G.; Beylin, A.; Zhao, M.; Rydel, T.; Gould, E. (2001): Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. In: *Nature* 410 (6826), S. 372–376. DOI: 10.1038/35066584.
- Shrager, Yael; Bayley, Peter J.; Bontempi, Bruno; Hopkins, Ramona O.; Squire, Larry R. (2007): Spatial memory and the human hippocampus. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (8), S. 2961–2966. DOI: 10.1073/pnas.0611233104.
- Sibanda, B. L.; Critchlow, S. E.; Begun, J.; Pei, X. Y.; Jackson, S. P.; Blundell, T. L.; Pellegrini, L. (2001): Crystal structure of an Xrcc4-DNA ligase IV complex. In: *Nature structural biology* 8 (12), S. 1015–1019. DOI: 10.1038/nsb725.
- Sibille, Jérémie; Pannasch, Ulrike; Rouach, Nathalie (2014): Astroglial potassium clearance contributes to short-term plasticity of synaptically evoked currents at the tripartite synapse. In: *The Journal of physiology* 592 (1), S. 87–102. DOI: 10.1113/jphysiol.2013.261735.
- Siddiqi, M. A.; Bothe, E. (1987): Single- and double-strand break formation in DNA irradiated in aqueous solution: dependence on dose and OH radical scavenger concentration. In: *Radiation research* 112 (3), S. 449–463.
- Siede, W.; Friedl, A. A.; Dianova, I.; Eckardt-Schupp, F.; Friedberg, E. C. (1996): The *Saccharomyces cerevisiae* Ku autoantigen homologue affects radiosensitivity only in the absence of homologous recombination. In: *Genetics* 142 (1), S. 91–102.
- Siegel, George J.; Agranoff, Bernard W. (Hg.) (1994): Basic neurochemistry. Molecular, cellular, and medical aspects. 5. ed. New York: Raven Press.
- Sienkiewicz, Z. J.; Haylock, R. G.; Saunders, R. D. (1994): Prenatal irradiation and spatial memory in mice: investigation of dose-response relationship. In: *International journal of radiation biology* 65 (5), S. 611–618. DOI: 10.1080/09553009414550701.
- Sierra, Amanda; Encinas, Juan M.; Deudero, Juan J. P.; Chancey, Jessica H.; Enikolopov, Grigori; Overstreet-Wadiche, Linda S. et al. (2010): Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. In: *Cell stem cell* 7 (4), S. 483–495. DOI: 10.1016/j.stem.2010.08.014.
- Sigel, Erwin; Steinmann, Michael E. (2012): Structure, function, and modulation of GABA(A) receptors. In: *The Journal of biological chemistry* 287 (48), S. 40224–40231. DOI: 10.1074/jbc.R112.386664.
- Smart, I. (1961): The subependymal layer of the mouse brain and its cell production as shown by radioautography after thymidine-H³ injection. In: *J. Comp. Neurol.* 116 (3), S. 325–347. DOI: 10.1002/cne.901160306.
- Snyder, J. S.; Kee, N.; Wojtowicz, J. M. (2001): Effects of adult neurogenesis on synaptic plasticity in the rat dentate gyrus. In: *Journal of neurophysiology* 85 (6), S. 2423–2431. DOI: 10.1152/jn.2001.85.6.2423.
- Solinger, Jachen A.; Kiianitsa, Konstantin; Heyer, Wolf-Dietrich (2002): Rad54, a Swi2/Snf2-like recombinational repair protein, disassembles Rad51:dsDNA filaments. In: *Molecular cell* 10 (5), S. 1175–1188.
- Sommer, Bernd; Köhler, Martin; Sprengel, Rolf; Seeburg, Peter H. (1991): RNA editing in brain controls a determinant of ion flow in glutamate-gated channels. In: *Cell* 67 (1), S. 11–19. DOI: 10.1016/0092-8674(91)90568-j.
- Song, Juan; Zhong, Chun; Bonaguidi, Michael A.; Sun, Gerald J.; Hsu, Derek; Gu, Yan et al. (2012): Neuronal circuitry mechanism regulating adult quiescent neural stem-cell fate decision. In: *Nature* 489 (7414), S. 150–154. DOI: 10.1038/nature11306.
- Song, M-S; Learman, C. R.; Ahn, K-C; Baker, G. B.; Kippe, J.; Field, E. M.; Dunbar, G. L. (2015): In vitro validation of effects of BDNF-expressing mesenchymal stem cells on neurodegeneration in primary cultured neurons of APP/PS1 mice. In: *Neuroscience* 307, S. 37–50. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2015.08.011.
- Sonntag, Clemens von (1987): The chemical basis of radiation biology. London: Taylor & Francis.
- Sonoda, E.; Sasaki, M. S.; Morrison, C.; Yamaguchi-Iwai, Y.; Takata, M.; Takeda, S. (1999): Sister chromatid exchanges are mediated by homologous recombination in vertebrate cells. In: *Molecular and cellular biology* 19 (7), S. 5166–5169. DOI: 10.1128/mcb.19.7.5166.
- Sonoda, Eiichiro; Hohegger, Helfrid; Saberi, Alihossein; Taniguchi, Yoshihito; Takeda, Shunichi (2006): Differential usage of non-homologous end-joining and homologous recombination in double strand break repair. In: *DNA repair* 5 (9-10), S. 1021–1029. DOI: 10.1016/j.dnarep.2006.05.022.
- Sontheimer, H.; Kettenmann, H.; Backus, K. H.; Schachner, M. (1988): Glutamate opens Na⁺/K⁺ channels in cultured astrocytes. In: *Glia* 1 (5), S. 328–336. DOI: 10.1002/glia.440010505.
- Squire, L. R.; Zola, S. M. (1996): Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (24), S. 13515–13522. DOI: 10.1073/pnas.93.24.13515.
- Squire, Larry R.; Stark, Craig E. L.; Clark, Robert E. (2004): The medial temporal lobe. In: *Annual Review of Neuroscience* 27, S. 279–306. DOI: 10.1146/annurev.neuro.27.070203.144130.
- Stacey, Dennis W. (2003): Cyclin D1 serves as a cell cycle regulatory switch in actively proliferating cells. In: *Current opinion in cell biology* 15 (2), S. 158–163. DOI: 10.1016/s0955-0674(03)00008-5.

- Stevens, Beth; Allen, Nicola J.; Vazquez, Luis E.; Howell, Gareth R.; Christopherson, Karen S.; Nouri, Navid et al. (2007): The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. In: *Cell* 131 (6), S. 1164–1178. DOI: 10.1016/j.cell.2007.10.036.
- Stout, Julie C.; Paulsen, Jane S.; Queller, Sarah; Solomon, Andrea C.; Whitlock, Kathryn B.; Campbell, J. Colin et al. (2011): Neurocognitive signs in prodromal Huntington disease. In: *Neuropsychology* 25 (1), S. 1–14. DOI: 10.1037/a0020937.
- Suberbielle, Elsa; Sanchez, Pascal E.; Kravitz, Alexxai V.; Wang, Xin; Ho, Kaitlyn; Eilertson, Kirsten et al. (2013): Physiologic brain activity causes DNA double-strand breaks in neurons, with exacerbation by amyloid- β . In: *Nature neuroscience* 16 (5), S. 613. DOI: 10.1038/nn.3356.
- Sukhatme, Vikas P.; Cao, Xinmin; Chang, Louise C.; Tsai-Morris, Chon-Hwa; Stamenkovich, Dorothy; Ferreira, Paulo C.P. et al. (1988): A zinc finger-encoding gene coregulated with c-fos during growth and differentiation, and after cellular depolarization. In: *Cell* 53 (1), S. 37–43. DOI: 10.1016/0092-8674(88)90485-0.
- Sullivan, K. F.; Cleveland, D. W. (1986): Identification of conserved isotype-defining variable region sequences for four vertebrate beta tubulin polypeptide classes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (12), S. 4327–4331. DOI: 10.1073/pnas.83.12.4327.
- Surma-aho, O.; Niemelä, M.; Vilkkilä, J.; Kouri, M.; Brander, A.; Salonen, O. et al. (2001): Adverse long-term effects of brain radiotherapy in adult low-grade glioma patients. In: *Neurology* 56 (10), S. 1285–1290. DOI: 10.1212/wnl.56.10.1285.
- Swagemakers, S. M.; Essers, J.; Wit, J. de; Hoeijmakers, J. H.; Kanaar, R. (1998): The human RAD54 recombinational DNA repair protein is a double-stranded DNA-dependent ATPase. In: *The Journal of biological chemistry* 273 (43), S. 28292–28297. DOI: 10.1074/jbc.273.43.28292.
- Symington, Lorraine S.; Gautier, Jean (2011): Double-Strand Break End Resection and Repair Pathway Choice. In: *Annual review of genetics* 45 (1), S. 247–271. DOI: 10.1146/annurev-genet-110410-132435.
- Szyndler, Janusz; Maciejak, Piotr; Wisłowska-Stanek, Aleksandra; Lehner, Małgorzata; Płaźnik, Adam (2013): Changes in the Egr1 and Arc expression in brain structures of pentylenetetrazole-kindled rats. In: *Pharmacological Reports* 65 (2), S. 368–378. DOI: 10.1016/S1734-1140(13)71012-0.
- Tacconi, Eliana M. C.; Tarsounas, Madalena (2015): How homologous recombination maintains telomere integrity. In: *Chromosoma* 124 (2), S. 119–130. DOI: 10.1007/s00412-014-0497-2.
- Tada, E.; Parent, J.M.; Lowenstein, D.H.; Fike, J.R. (2000): X-irradiation causes a prolonged reduction in cell proliferation in the dentate gyrus of adult rats. In: *Neuroscience* 99 (1), S. 33–41. DOI: 10.1016/S0306-4522(00)00151-2.
- Takadera, Tsuneo; Sakamoto, Yukari; Ohyashiki, Takao (2004): NMDA receptor 2B-selective antagonist ifenprodil-induced apoptosis was prevented by glycogen synthase kinase-3 inhibitors in cultured rat cortical neurons. In: *Brain Research* 1020 (1-2), S. 196–203. DOI: 10.1016/j.brainres.2004.06.035.
- Takata, M.; Sasaki, M. S.; Sonoda, E.; Morrison, C.; Hashimoto, M.; Utsumi, H. et al. (1998): Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. In: *The EMBO journal* 17 (18), S. 5497–5508. DOI: 10.1093/emboj/17.18.5497.
- Takeuchi, Takashi; Nakamura, Harukazu (2014): Cell proliferation and development. Preface. In: *Development, growth & differentiation* 56 (5), S. 323. DOI: 10.1111/dgd.12142.
- Tani, Hiroaki; Dulla, Chris G.; Farzampour, Zoya; Taylor-Weiner, Amaro; Huguenard, John R.; Reimer, Richard J. (2014): A local glutamate-glutamine cycle sustains synaptic excitatory transmitter release. In: *Neuron* 81 (4), S. 888–900. DOI: 10.1016/j.neuron.2013.12.026.
- Tashiro, Ayumu; Sandler, Vladislav M.; Toni, Nicolas; Zhao, Chunmei; Gage, Fred H. (2006): NMDA-receptor-mediated, cell-specific integration of new neurons in adult dentate gyrus. In: *Nature* 442 (7105), S. 929–933. DOI: 10.1038/nature05028.
- Teng, E.; Squire, L. R. (1999): Memory for places learned long ago is intact after hippocampal damage. In: *Nature* 400 (6745), S. 675–677. DOI: 10.1038/23276.
- Terry, Alvin V. Alvin V. (2009): Spatial Navigation (Water Maze) Tasks. In: Jerry J. Buccafusco (Hg.): *Frontiers in Neuroscience : Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. Boca Raton (FL).
- Thiel, G. (1993): Synapsin I, synapsin II, and synaptophysin: marker proteins of synaptic vesicles. In: *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* 3 (1), S. 87–95. DOI: 10.1111/j.1750-3639.1993.tb00729.x.
- Thompson, R. F.; Kim, J. J. (1996): Memory systems in the brain and localization of a memory. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (24), S. 13438–13444. DOI: 10.1073/pnas.93.24.13438.
- Tichy, Elisia D.; Stambrook, Peter J. (2008): DNA repair in murine embryonic stem cells and differentiated cells. In: *Experimental cell research* 314 (9), S. 1929–1936. DOI: 10.1016/j.yexcr.2008.02.007.
- Tischmeyer, Wolfgang; Kaczmarek, Leszek; Strauss, Michael; Jork, Reinhard; Matthies, Hansjürgen (1990): Accumulation of c-fos mRNA in rat hippocampus during acquisition of a brightness discrimination. In: *Behavioral and Neural Biology* 54 (2), S. 165–171. DOI: 10.1016/0163-1047(90)91366-J.
- Toni, Nicolas; Teng, E. Matthew; Bushong, Eric A.; Aimone, James B.; Zhao, Chunmei; Consiglio, Antonella et al. (2007): Synapse formation on neurons born in the adult hippocampus. In: *Nature neuroscience* 10 (6), S. 727–734. DOI: 10.1038/nn1908.
- Tozuka, Yusuke; Fukuda, Satoshi; Namba, Takashi; Seki, Tatsunori; Hisatsune, Tatsuhiko (2005): GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. In: *Neuron* 47 (6), S. 803–815. DOI: 10.1016/j.neuron.2005.08.023.

- Tracy, Tara E.; Gan, Li (2018): Tau-mediated synaptic and neuronal dysfunction in neurodegenerative disease. In: *Current Opinion in Neurobiology* 51, S. 134–138. DOI: 10.1016/j.conb.2018.04.027.
- Traynelis, Stephen F.; Wollmuth, Lonnie P.; McBain, Chris J.; Menniti, Frank S.; Vance, Katie M.; Ogden, Kevin K. et al. (2010): Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. In: *Pharmacological reviews* 62 (3), S. 405–496. DOI: 10.1124/pr.109.002451.
- Trotter, Kevin W.; King, Heather A.; Archer, Trevor K. (2015): Glucocorticoid Receptor Transcriptional Activation via the BRG1-Dependent Recruitment of TOP2B and Ku70/86. In: *Molecular and cellular biology* 35 (16), S. 2799–2817. DOI: 10.1128/MCB.00230-15.
- Tucker, James D. (2008): Low-dose ionizing radiation and chromosome translocations: a review of the major considerations for human biological dosimetry. In: *Mutation research* 659 (3), S. 211–220. DOI: 10.1016/j.mrrev.2008.04.001.
- Tucker, Laura B.; McCabe, Joseph T. (2017): Behavior of Male and Female C57BL/6J Mice Is More Consistent with Repeated Trials in the Elevated Zero Maze than in the Elevated Plus Maze. In: *Frontiers in behavioral neuroscience* 11, S. 13. DOI: 10.3389/fnbeh.2017.00013.
- Tulving, Endel; Markowitsch, Hans J. (1998): Episodic and declarative memory: Role of the hippocampus. In: *Hippocampus* 8 (3), S. 198–204. DOI: 10.1002/(SICI)1098-1063(1998)8:3<198::AID-HIPO2>3.0.CO;2-G.
- Tuszynski, M. H.; Gage, F. H. (1995): Maintaining the neuronal phenotype after injury in the adult CNS. Neurotrophic factors, axonal growth substrates, and gene therapy. In: *Molecular neurobiology* 10 (2-3), S. 151–167. DOI: 10.1007/BF02740673.
- Urgolites, Zhisen J.; Kim, Soyun; Hopkins, Ramona O.; Squire, Larry R. (2016): Map reading, navigating from maps, and the medial temporal lobe. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (50), S. 14289–14293. DOI: 10.1073/pnas.1617786113.
- Uusküla-Reimand, Liis; Hou, Huayun; Samavarchi-Tehrani, Payman; Rudan, Matteo Vietri; Liang, Minggao; Medina-Rivera, Alejandra et al. (2016): Topoisomerase II beta interacts with cohesin and CTCF at topological domain borders. In: *Genome biology* 17 (1), S. 182. DOI: 10.1186/s13059-016-1043-8.
- Uwechue, Nneka M.; Marx, Mari-Carmen; Chevy, Quentin; Billups, Brian (2012): Activation of glutamate transport evokes rapid glutamine release from perisynaptic astrocytes. In: *The Journal of physiology* 590 (10), S. 2317–2331. DOI: 10.1113/jphysiol.2011.226605.
- Valko, M.; Morris, H.; Mazúr, M.; Raptá, P.; Bilton, R. F. (2001): Oxygen free radical generating mechanisms in the colon: do the semiquinones of vitamin K play a role in the aetiology of colon cancer? In: *Biochimica et biophysica acta* 1527 (3), S. 161–166. DOI: 10.1016/S0304-4165(01)00163-5.
- Valko, Marian; Leibfritz, Dieter; Moncol, Jan; Cronin, Mark T. D.; Mazur, Milan; Telser, Joshua (2007): Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 39 (1), S. 44–84. DOI: 10.1016/j.biocel.2006.07.001.
- van Pelt, J.; Corner, M. A.; Wolters, P. S.; Rutten, W. L. C.; Ramakers, G. J. A. (2004): Longterm stability and developmental changes in spontaneous network burst firing patterns in dissociated rat cerebral cortex cell cultures on multielectrode arrays. In: *Neuroscience letters* 361 (1-3), S. 86–89. DOI: 10.1016/j.neulet.2003.12.062.
- van Praag, H.; Christie, B. R.; Sejnowski, T. J.; Gage, F. H. (1999): Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (23), S. 13427–13431. DOI: 10.1073/pnas.96.23.13427.
- Vanhoutte, Peter; Bading, Hilmar (2003): Opposing roles of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in neuronal calcium signalling and BDNF gene regulation. In: *Current Opinion in Neurobiology* 13 (3), S. 366–371. DOI: 10.1016/S0959-4388(03)00073-4.
- Verkhatsky, A.; Orkand, R. K.; Kettenmann, H. (1998): Glial calcium: homeostasis and signaling function. In: *Physiological reviews* 78 (1), S. 99–141. DOI: 10.1152/physrev.1998.78.1.99.
- Verreet, Tine; Quintens, Roel; van Dam, Debby; Verslegers, Mieke; Tanori, Mirella; Casciati, Arianna et al. (2015): A multidisciplinary approach unravels early and persistent effects of X-ray exposure at the onset of prenatal neurogenesis. In: *Journal of Neurodevelopmental Disorders* 7 (1). DOI: 10.1186/1866-1955-7-3.
- Vorhees, Charles V.; Williams, Michael T. (2014): Assessing spatial learning and memory in rodents. In: *ILAR journal* 55 (2), S. 310–332. DOI: 10.1093/ilar/ilu013.
- Vyjayanti, V. N.; Rao, Kalluri Subba (2006): DNA double strand break repair in brain: reduced NHEJ activity in aging rat neurons. In: *Neuroscience letters* 393 (1), S. 18–22. DOI: 10.1016/j.neulet.2005.09.053.
- Vyklicky, V.; Korinek, M.; Smejkalova, T.; Balik, A.; Krausova, B.; Kaniakova, M. et al. (2014): Structure, function, and pharmacology of NMDA receptor channels. In: *Physiological research* 63 Suppl 1, S191-203.
- Wada, T.; Takagi, T.; Yamaguchi, Y.; Ferdous, A.; Imai, T.; Hirose, S. et al. (1998): DSIF, a novel transcription elongation factor that regulates RNA polymerase II processivity, is composed of human Spt4 and Spt5 homologs. In: *Genes & development* 12 (3), S. 343–356. DOI: 10.1101/gad.12.3.343.
- Walker, J. R.; Corpina, R. A.; Goldberg, J. (2001): Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. In: *Nature* 412 (6847), S. 607–614. DOI: 10.1038/35088000.
- Wang, J. C. (1998): Moving one DNA double helix through another by a type II DNA topoisomerase: the story of a simple molecular machine. In: *Quarterly reviews of biophysics* 31 (2), S. 107–144. DOI: 10.1017/s0033583598003424.
- Wang, James C. (2002): Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 3 (6), S. 430–440. DOI: 10.1038/nrm831.

- Wang, Ling; Roy, Shambhu K.; Eastmond, David A. (2007): Differential cell cycle-specificity for chromosomal damage induced by merbarone and etoposide in V79 cells. In: *Mutation research* 616 (1-2), S. 70–82. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2006.11.023.
- Wang, Xuejuan; Chu, Huanyu; Lv, Mengjuan; Zhang, Zhihui; Qiu, Shuwan; Liu, Haiyan et al. (2016): Structure of the intact ATM/Tel1 kinase. In: *Nature communications* 7, S. 11655. DOI: 10.1038/ncomms11655.
- Wang, Yingpeng; Hameed, Mustafa Q.; Rakhade, Sanjay N.; Iglesias, Antonio H.; Muller, Paul A.; Mou, Dan-Lei; Rotenberg, Alexander (2014): Hippocampal immediate early gene transcription in the rat fluid percussion traumatic brain injury model. In: *Neuroreport* 25 (12), S. 954–959. DOI: 10.1097/WNR.0000000000000219.
- Ward, Irene M.; Minn, Kay; Jorda, Katherine G.; Chen, Junjie (2003): Accumulation of checkpoint protein 53BP1 at DNA breaks involves its binding to phosphorylated histone H2AX. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (22), S. 19579–19582. DOI: 10.1074/jbc.C300117200.
- Ward, J. F. (1985): Biochemistry of DNA Lesions. In: *Radiation research* 104 (2), S103. DOI: 10.2307/3576637.
- Ward, J. F. (1988): DNA Damage Produced by Ionizing Radiation in Mammalian Cells: Identities, Mechanisms of Formation, and Reparability. In: Bd. 35: Elsevier (Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology), S. 95–125.
- Watanabe, Hiroshige; Murata, Yuji; Miura, Masahiko; Hasegawa, Masatoshi; Kawamoto, Tadamumi; Shibuya, Hitoshi (2006): In-vivo visualization of radiation-induced apoptosis using (125)I-annexin V. In: *Nuclear medicine communications* 27 (1), S. 81–89. DOI: 10.1097/01.mnm.0000189778.60496.30.
- Watanabe, M.; Inoue, Y.; Sakimura, K.; Mishina, M. (1992): Developmental changes in distribution of NMDA receptor channel subunit mRNAs. In: *Neuroreport* 3 (12), S. 1138–1140. DOI: 10.1097/00001756-199212000-00027.
- Watkins, J. C.; Evans, R. H. (1981): Excitatory amino acid transmitters. In: *Annual review of pharmacology and toxicology* 21, S. 165–204. DOI: 10.1146/annurev.pa.21.040181.001121.
- Weber, Margaret D.; Barbaro, Giuseppe (Hg.) (2006): Trends in chemotherapy research. New York, N.Y.: Nova Biomedical Books.
- Wei, Pei-Chi; Chang, Amelia N.; Kao, Jennifer; Du, Zhou; Meyers, Robin M.; Alt, Frederick W.; Schwer, Bjoern (2016): Long Neural Genes Harbor Recurrent DNA Break Clusters in Neural Stem/Progenitor Cells. In: *Cell* 164 (4), S. 644–655. DOI: 10.1016/j.cell.2015.12.039.
- Weissman, Tamily A.; Riquelme, Patricio A.; Ivic, Lidija; Flint, Alexander C.; Kriegstein, Arnold R. (2004): Calcium waves propagate through radial glial cells and modulate proliferation in the developing neocortex. In: *Neuron* 43 (5), S. 647–661. DOI: 10.1016/j.neuron.2004.08.015.
- West, Anne E.; Greenberg, Michael E. (2011): Neuronal activity-regulated gene transcription in synapse development and cognitive function. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3 (6). DOI: 10.1101/cshperspect.a005744.
- Whitney, Nicholas P.; Peng, Hui; Erdmann, Nathan B.; Tian, Changhai; Monaghan, Daniel T.; Zheng, Jialin C. (2008): Calcium-permeable AMPA receptors containing Q/R-unedited GluR2 direct human neural progenitor cell differentiation to neurons. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22 (8), S. 2888–2900. DOI: 10.1096/fj.07-104661.
- Williams, K. (1993): Ifenprodil discriminates subtypes of the N-methyl-D-aspartate receptor: selectivity and mechanisms at recombinant heteromeric receptors. In: *Molecular pharmacology* 44 (4), S. 851–859.
- Wilson, M. A.; McNaughton, B. L. (1993): Dynamics of the hippocampal ensemble code for space. In: *Science (New York, N.Y.)* 261 (5124), S. 1055–1058. DOI: 10.1126/science.8351520.
- Winocur, Gordon; Wojtowicz, J. Martin; Sekeres, Melanie; Snyder, Jason S.; Wang, Sabrina (2006): Inhibition of neurogenesis interferes with hippocampus-dependent memory function. In: *Hippocampus* 16 (3), S. 296–304. DOI: 10.1002/hipo.20163.
- Wolner, Branden; van Komen, Stephen; Sung, Patrick; Peterson, Craig L. (2003): Recruitment of the recombinational repair machinery to a DNA double-strand break in yeast. In: *Molecular cell* 12 (1), S. 221–232.
- Wong, E. H.; Kemp, J. A.; Priestley, T.; Knight, A. R.; Woodruff, G. N.; Iversen, L. L. (1986): The anticonvulsant MK-801 is a potent N-methyl-D-aspartate antagonist. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (18), S. 7104–7108. DOI: 10.1073/pnas.83.18.7104.
- Wong, Roger H. F.; Chang, Inhwan; Hudak, Carolyn S. S.; Hyun, Suzanne; Kwan, Hiu-Yee; Sul, Hei Sook (2009): A role of DNA-PK for the metabolic gene regulation in response to insulin. In: *Cell* 136 (6), S. 1056–1072. DOI: 10.1016/j.cell.2008.12.040.
- Woo, Jae Hee; Han, Jong in; Baik, Hee Jung; Lee, Heeseung (2012): Effects of clonidine on the activity of the rat glutamate transporter EAAT3 expressed in Xenopus oocytes. In: *Korean journal of anesthesiology* 62 (3), S. 266–271. DOI: 10.4097/kjae.2012.62.3.266.
- Worley, P. F.; Christy, B. A.; Nakabeppu, Y.; Bhat, R. V.; Cole, A. J.; Baraban, J. M. (1991): Constitutive expression of zif268 in neocortex is regulated by synaptic activity. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (12), S. 5106–5110. DOI: 10.1073/pnas.88.12.5106.
- Wu, Peter H.; Coultrap, Steven; Pinnix, Chelsea; Davies, Kurtis D.; Tailor, Ramesh; Ang, Kian K. et al. (2012): Radiation induces acute alterations in neuronal function. In: *PloS one* 7 (5), e37677. DOI: 10.1371/journal.pone.0037677.
- Xu, Jian; Kurup, Pradeep; Zhang, Yongfang; Goebel-Goody, Susan M.; Wu, Peter H.; Hawasli, Ammar H. et al. (2009): Extrasynaptic NMDA receptors couple preferentially to excitotoxicity via calpain-mediated cleavage of STEP. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29 (29), S. 9330–9343. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2212-09.2009.
- Yamaguchi, Yuki; Takagi, Toshiyuki; Wada, Tadashi; Yano, Keiichi; Furuya, Akiko; Sugimoto, Seiji et al. (1999): NELF, a Multisubunit Complex Containing RD, Cooperates with DSIF to Repress RNA Polymerase II Elongation. In: *Cell* 97 (1), S. 41–51. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80713-8.

-
- Yang, Jenq-Lin; Lin, Yu-Ting; Chuang, Pei-Chin; Bohr, Vilhelm A.; Mattson, Mark P. (2014): BDNF and Exercise Enhance Neuronal DNA Repair by Stimulating CREB-Mediated Production of Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 1. In: *Neuromol Med* 16 (1), S. 161–174. DOI: 10.1007/s12017-013-8270-x.
- Yang, Jenq-Lin; Sykora, Peter; Wilson, David M.; Mattson, Mark P.; Bohr, Vilhelm A. (2011): The excitatory neurotransmitter glutamate stimulates DNA repair to increase neuronal resiliency. In: *Mechanisms of ageing and development* 132 (8-9), S. 405–411. DOI: 10.1016/j.mad.2011.06.005.
- Yap, Ee-Lynn; Greenberg, Michael E. (2018): Activity-Regulated Transcription: Bridging the Gap between Neural Activity and Behavior. In: *Neuron* 100 (2), S. 330–348. DOI: 10.1016/j.neuron.2018.10.013.
- Ying, Qi-Long; Smith, Austin G. (2003): Defined conditions for neural commitment and differentiation. In: *Methods in enzymology* 365, S. 327–341.
- Yoshimaru, H.; Otake, M.; Schull, W. J.; Funamoto, S. (1995): Further observations on abnormal brain development caused by prenatal A-bomb exposure to ionizing radiation. In: *International journal of radiation biology* 67 (3), S. 359–371. DOI: 10.1080/09553009514550411.
- Yoshimura, Nagahisa; Kikuchi, Takanobu; Kuroiwa, Sachiko; Gaun, Satoko (2003): Differential temporal and spatial expression of immediate early genes in retinal neurons after ischemia-reperfusion injury. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 44 (5), S. 2211–2220. DOI: 10.1167/iovs.02-0704.
- Zanni, Giulia; Goto, Shinobu; Fragopoulou, Adamantia F.; Gaudenzi, Giulia; Naidoo, Vinogran; Di Martino, Elena et al. (2019): Lithium treatment reverses irradiation-induced changes in rodent neural progenitors and rescues cognition. In: *Molecular psychiatry*. DOI: 10.1038/s41380-019-0584-0.
- Zhang, Li-Nan; Wang, Qi; Xian, Xiao-Hui; Qi, Jie; Liu, Li-Zhe; Li, Wen-Bin (2019): Astrocytes enhance the tolerance of rat cortical neurons to glutamate excitotoxicity. In: *Molecular medicine reports* 19 (3), S. 1521–1528. DOI: 10.3892/mmr.2018.9799.
- Zhang, Sheng-Jia; Zou, Ming; Lu, Li; Lau, David; Ditzel, Désirée A. W.; Delucinge-Vivier, Celine et al. (2009): Nuclear calcium signaling controls expression of a large gene pool: identification of a gene program for acquired neuroprotection induced by synaptic activity. In: *PLoS genetics* 5 (8), e1000604. DOI: 10.1371/journal.pgen.1000604.
- Zhao, Chunmei; Teng, E. Matthew; Summers, Robert G.; Ming, Guo-li; Gage, Fred H. (2006): Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26 (1), S. 3–11. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3648-05.2006.
- Zhao, Yu; Wang, Liguang; Ren, Shancheng; Wang, Lan; Blackburn, Patrick R.; McNulty, Melissa S. et al. (2016): Activation of P-TEFb by Androgen Receptor-Regulated Enhancer RNAs in Castration-Resistant Prostate Cancer. In: *Cell reports* 15 (3), S. 599–610. DOI: 10.1016/j.celrep.2016.03.038.
- Zheng, Kaiyu; Scimemi, Annalisa; Rusakov, Dmitri A. (2008): Receptor actions of synaptically released glutamate: the role of transporters on the scale from nanometers to microns. In: *Biophysical Journal* 95 (10), S. 4584–4596. DOI: 10.1529/biophysj.108.129874.
- Zhong, Suijuan; Ding, Wenyu; Le Sun; Lu, Yufeng; Dong, Hao; Fan, Xiaoying et al. (2020): Decoding the development of the human hippocampus. In: *Nature* 577 (7791), S. 531–536. DOI: 10.1038/s41586-019-1917-5.
- Zhou, Q.; Wang, S.; Anderson, D. J. (2000): Identification of a novel family of oligodendrocyte lineage-specific basic helix-loop-helix transcription factors. In: *Neuron* 25 (2), S. 331–343. DOI: 10.1016/S0896-6273(00)80898-3.
- Zhou, Y.; Danbolt, N. C. (2014): Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. In: *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)* 121 (8), S. 799–817. DOI: 10.1007/s00702-014-1180-8.
- Zito, Karen; Svoboda, Karel (2002): Activity-Dependent Synaptogenesis in the Adult Mammalian Cortex. In: *Neuron* 35 (6), S. 1015–1017. DOI: 10.1016/S0896-6273(02)00903-0.

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name	Katja Häupl
Geburtsdatum	03.02.1990
Geburtsort	Rostock

Bildungsweg

08/2015 – 03/2020	Wissenschaftliche Mitarbeiterin (Doktorandin) – AG Laube, TUD Schwerpunkt: Neurophysiologische und Neurosensorische Systeme Thema der Arbeit: Kurz- und langfristige Auswirkungen strahleninduzierter DNS DSBs auf das neuronale Netzwerk am <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> Mausmodell
10/2012 – 07/2015	Master Studiengang Technisch Biologie - TU Darmstadt Thema der Arbeit: Charakterisierung von Rezeptor-medierten Signalwegen in Glioblastom-Neurosphären
10/2009 – 09/2012	Bachelor Studiengang Biologie - TU Darmstadt Thema der Arbeit: Mechanismen des Obatoclax-induzierten Zelltodes in Gliomzellen
08/2006 – 06/2009	Abitur – Claus-von- Stauffenberg-Schule, 63110 Rodgau

Posterpräsentationen

BNA 2017 in Birmingham - Festival of Neuroscience	Abstract Titel: <i>“The excitatory neurotransmitter glutamate influences the DNA damage repair in in vitro differentiated murine neurons”</i>
GBS 2018 in Frankfurt - Gesellschaft für Biologische Strahlenforschung	Abstract Titel: <i>“Glutamate influences the repair of irradiation induced DNA double strand breaks in neurons but not in astrocytes”</i>
Neurogenesis Conference 2019 - Bahamas	Abstract Titel: <i>“In vitro differentiated neurons show an improved repair of DNA DSBs after glutamate treatment”</i>

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz besonders bei Prof. Dr. Bodo Laube bedanken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, an einem so interessanten Thema zu forschen, mich dabei immer mit guten Einfällen unterstützt und mir die Freiheit und das Vertrauen geschenkt hat mich methodisch vielseitig zu entfalten.

Ich danke Prof. Dr. Gerhard Thiel für die Übernahme des Koreferates und besonders zum Ende der Promotionsphase für ein offenes Ohr und Asyl in seiner Arbeitsgruppe, wenn mir meine vier Bürowände zu eng wurden.

Außerdem danken möchte ich Axel Klink, der mir mit Rat und Tat rund um das Thema Verhaltensversuche beistand und mir freundlicherweise seine experimentellen Daten der Wildtypmäuse für diese Arbeit zur Verfügung gestellt hat.

Ein riesiger Dank geht an die „alte“ und „neue“ AG Laube. Besonders meinen Bürokollegen Henrik und Kiki und später Juliane und Selina möchte ich mich für die Gespräche, Aufmunterungen und die Zeit bedanken die wir miteinander verbracht haben. An dieser Stelle möchte ich auch unseren Büro-Therapiestuhl erwähnen und mich bei all seinen Besuchern, darunter an erster Stelle Kai, für die kleinen Ablenkungen bedanken. Danke auch an Kirsten, Gabi, Nina, Michi, Alex, Raj und Max für die schöne Arbeitsatmosphäre.

Besonders danken möchte ich zudem Dr. Bastian Roth, der Fels in der Brandung, der immer ein offenes Ohr für jegliche Probleme hat und häufig dazu auch die passende Lösung. Ein großer Dank für seinen unermüdlichen Arbeitseinsatz für die AG und sein heiteres Wesen.

Ein mindestens ebenso großer Dank geht an Dr. Oliver Rauh. Nicht nur, dass du dich mit dem Großteil der Korrektur rumschlagen musstest, etliche Gespräche und Diskussionen über diese Arbeit sind dir auch nicht erspart geblieben. Ich hoffe das hat unserer Freundschaft nicht geschadet. Danke für die Zeit und den Sport – das hat mich mehr als einmal davor bewahrt durchzudrehen.

Danken möchte ich an dieser Stelle auch meiner Lieblingsschwester Betty Häupl, du bist für mich immer ein Vorbild gewesen.

Mein größter Dank geht an Tilo Sielaff. Danke für den Rückhalt, die Liebe und das Verständnis, dass du mir all die Jahre entgegengebracht hast. Durch dich bin ich erst so weit gekommen. Danke, dass du meine Welt zusammenhältst.